

Análise de amostras de clientes da MTBrandão

Nádia Catarina Martins de Figueiredo

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências

Universidade do Porto

2017

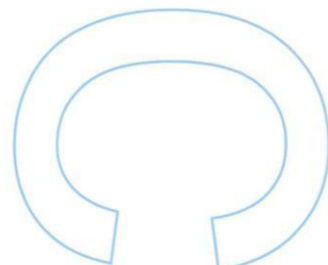
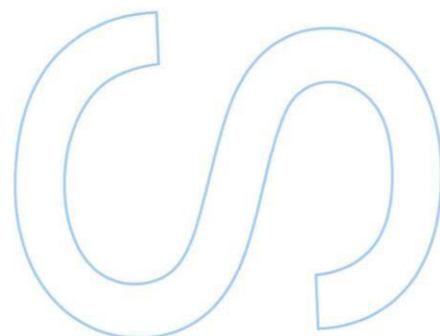
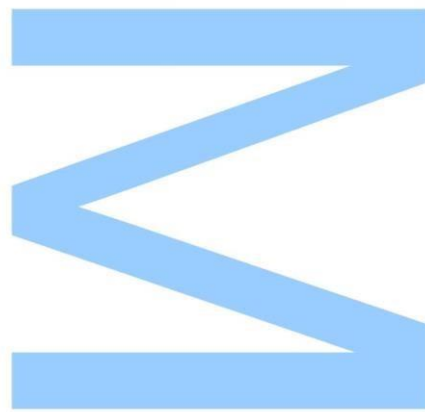
Orientador (Faculdade)

Jorge Marques Gonçalves, Professor Auxiliar,

Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Orientador (Empresa)

Susana Pereira, Licenciada em Química, MTBrandão, Lda.

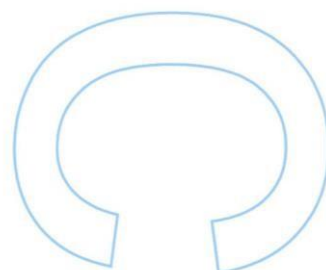
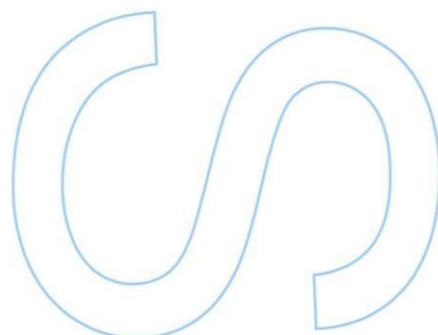
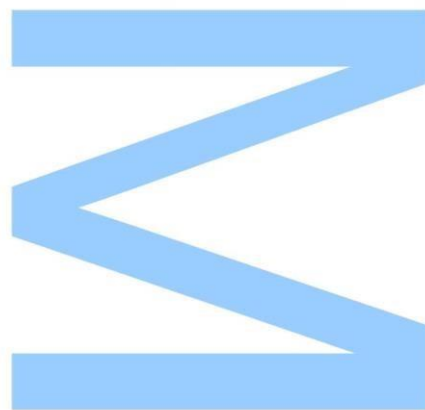




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Jorge Gonçalves por toda a disponibilidade e apoio dispensados ao longo deste estágio.

Agradeço também à Susana Pereira pelo acompanhamento e pela ajuda durante o trabalho prático desenvolvido na empresa. A todas as pessoas da MTBrandão que, sem exceção, me acolheram muito bem e sempre com um sorriso.

Aos meus avós, Rosa e Edgar, que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir sempre em frente. Sem eles, não tinha sido possível.

Por fim, a todos os meus amigos que me acompanharam durante estes anos e que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa.

Muito obrigada a todos.

Resumo

Este projeto realizado em contexto empresarial, na empresa MTBrandão, Lda., tem como objetivo a otimização de técnicas como a cromatografia iónica, Karl Fischer volumétrico, bem assim como o dos respetivos softwares, no sentido de validar metodologias e desenvolver aplicações de acordo com as necessidades dos clientes da empresa.

Determinou-se o teor de açúcar em amostras de sumos de polpa de fruta por refratometria e através da utilização de um densímetro portátil de modo a obter e a comparar o grau *brix*. Foram analisadas amostras de vinho, com o objetivo de determinar o teor de álcool e, para isso, foi utilizado um *Alcolyzer Wine M*, equipamento da Anton Paar, específico para esta aplicação. Utilizou-se, ainda a técnica de Karl Fischer em modo volumétrico para determinar a quantidade de água presente em amostras de etanol.

A última parte do trabalho foi dedicada à validação de um método de análise de catiões e aniões por cromatografia iónica em águas de consumo humano.

Palavras chave: Karl Fischer volumétrico, refratometria, alcolyzer Wine M, densimetria, cromatografia iónica, validação

Abstract

This project was carried out in a business context, in the MTBrandão, Lda., with the objective of mastering techniques such as ionic chromatography, volumetric Karl Fischer, as well as the respective software, in order to validate methodologies and develop applications according to the needs of the company's customers.

The sugar content present in samples of fruit pulp juices was determined by refractometry and by the use of a portable densimeter in order to obtain and compare the brix degree. Wine samples were also analyzed as to determine the alcohol content and, for this, an Alcolyzer Wine M, an equipment of Anton Paar, was used. The Karl Fischer technique was also applied in volumetric mode to determine the amount of water present in ethanol samples.

The last part of the work consisted in the development of validation of a method of analysis of cations and anions by ion chromatography in drinking water.

Keywords: volumetric Karl Fischer, refractometry, alcolyzer Wine M, densimetry, ion chromatography, method validation

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	ii
Índice.....	iii
Lista de tabelas.....	vi
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas.....	x
I. Enquadramento	1
II. Aplicações práticas.....	2
2.1. Determinação do teor de água em etanol	2
2.1.1. Karl Fischer.....	2
2.1.1.1. KF Volumétrico	4
2.1.2. Parte Experimental	5
2.1.2.1. Reagentes	5
2.1.2.2. Material e equipamento.....	5
2.1.2.3. Amostras.....	6
2.1.2.4. Preparação do sistema e do drift.....	6
2.1.2.5. Determinação do título	6
2.1.2.6. Procedimento para a determinação de água nas amostras de etanol	7
2.1.3. Resultados e conclusões	8
2.2. Medição do teor de álcool no vinho utilizando o Alcolyzer Wine M.....	10
2.2.1. Espectroscopia de infravermelho próximo.....	10
2.2.1.1. Alcolyzer Wine M	13
2.2.2. Parte experimental	14
2.2.2.1. Reagentes	14
2.2.2.2. Material e Equipamento	14

2.2.2.3. Amostras.....	14
2.2.2.4. Calibração do equipamento	14
2.2.2.5. Medição das amostras de vinho.....	15
2.2.3. Resultados e conclusões	15
2.3. Determinação do teor de açúcares em sumos	17
2.3.1. Refratometria	17
2.3.2. Parte experimental	19
2.3.2.1. Material e Equipamento	19
2.3.2.2. Amostras.....	19
2.3.2.3. Medição	19
2.3.3. Resultados e conclusões	20
III. Validação de metodologia para a determinação de iões inorgânicos em águas para consumo humano	23
3.1. Iões inorgânicos na água para consumo humano	23
3.2. Cromatografia iónica.....	24
3.3. Validação do método analítico	27
3.3.1. Seletividade	27
3.3.2. Linearidade e gama de trabalho.....	28
3.3.3. Precisão.....	29
3.3.4. Exatidão.....	31
3.3.5. Limite de Detecção	31
3.3.6. Limite de Quantificação.....	32
3.4. Parte Experimental	32
3.4.1. Reagentes	32
3.4.2. Material e equipamento.....	33
3.4.3. Análise de catiões.....	33
3.4.4. Análise de aniões.....	34
3.4.5. Amostras de água.....	35
3.5. Resultados e discussão	35

3.5.1. Seletividade	35
3.5.2. Gama de trabalho e linearidade	37
3.5.3. Precisão.....	41
3.5.4. Exatidão.....	42
3.5.5. Limiares Analíticos	44
3.6. Análise amostras de água da torneira.....	45
3.7. Considerações finais.....	47
IV. Referências bibliográficas.....	48

Lista de tabelas

Tabela 1 - Resultados obtidos através de Karl Fischer Volumétrico para amostras de etanol, contendo diferentes teores de água, a temperatura de 25 °C. Na tabela, σ representa o desvio padrão absoluto e RSD representa o desvio padrão relativo em percentagem	9
Tabela 2 - Resultados obtidos para o limite de repetibilidade (r) do método	9
Tabela 3 - Medições para as amostras de vinho tinto e branco a 20 °C, aproximadamente	16
Tabela 4 - Resultados obtidos para os sumos de pêssgo e pera através do método refratométrico	21
Tabela 5 - Resultados obtidos para as amostras de sumos de pera e pêssgo através do densímetro	21
Tabela 6 - Resultados obtidos para o teste t de médias emparelhadas determinados pelos dois métodos em estudo para as amostras de sumo de pera e pêssgo	22
Tabela 7 - Tabela resumo das condições experimentais para a determinação dos catiões	34
Tabela 8 - Resumo das condições experimentais dos aniões	35
Tabela 9 - Gama de trabalho escolhida para os catiões, em padrões mistos	37
Tabela 10 - Gama de trabalho escolhida para os aniões, em padrões mistos	37
Tabela 11 - Resultados obtidos para o estudo de homogeneidade de variâncias, através do teste Fischer, dos catiões em estudo	39
Tabela 12 - Resultados obtidos para o estudo de homogeneidade de variâncias, através do teste Fischer, dos aniões em estudo	39
Tabela 13 - Resumo das equações das retas obtidas para os catiões em estudo, a partir de 5 pontos, e respetivos coeficientes de correlação	40
Tabela 14 - Resumo das equações das retas obtidas para os aniões em estudo, a partir de 5 pontos, e respetivos coeficientes de correlação	40
Tabela 15 - Resultados do teste estatístico de Mandel para cada um dos catiões no estudo de linearidade	40
Tabela 16 - Resultados do teste estatístico de Mandel para cada um dos aniões no estudo de linearidade	41
Tabela 17 - Resumo do estudo da precisão do método em condições de precisão intermédia, para n=10, na gama superior e inferior de trabalho.	42
Tabela 18 - Recuperações médias (R) obtidas para os catiões em 3 níveis de fortificação (NF), com n=3	43

Tabela 19 - Recuperações médias (R) obtidas para os aniões em 3 níveis de fortificação (NF), com n=3	43
Tabela 20 - Limites analíticos associados ao método, para a determinação dos catiões	44
Tabela 21 - Limites analíticos associados ao método, para a determinação dos aniões	44
Tabela 22 - Análise dos catiões, durante 3 dias, através de cromatografia iónica, para n =5	45
Tabela 23 - Resumo da análise dos aniões, durante 3 dias diferentes, através de cromatografia iónica, para n=5. Para determinar os aniões com *, a amostra foi dissolvida	45

Lista de figuras

Fig. 1 - Karl Fischer volumétrico, Metrohm.....	5
Fig. 2 - Representação do oscilador harmónico (A) e do oscilador anarmónico (B) para a energia potencial (U) de moléculas diatómicas.	12
Fig. 3 - Posição dos principais picos relativos às bandas de absorção no NIR. Entre os 700 nm e os 1900 nm estão representados os níveis de harmónicos e dos 1900 aos 2500 nm estão representadas as bandas de combinação.....	13
Fig. 4 - Alcozyzer Wine M da Anton Paar.....	14
Fig. 5 - Refração da luz em dois meios diferentes e refletância no mesmo meio.	18
Fig. 6 - Esquema de configuração de um refratómetro automático.	19
Fig. 7 - Refratómetro Abbemat 200, utilizado para as determinações.	19
Fig. 8 - Densímetro DMA 35.	20
Fig. 9 - Diagrama dos componentes instrumentais de cromatografia iónica não suprimida.	26
Fig. 10 - Diagrama dos componentes instrumentais da cromatografia iónica suprimida.	26
Fig. 11 - Esquema exemplificativo da cromatografia iónica utilizada: 1) amostrador; 2) bomba peristáltica; 3) eluente; 4) solução de ácido sulfúrico (apenas utilizada para a determinação de aniões); 5) bomba isocrática; 6) válvula de purga; 7) amortecedor; 8) válvula de injeção com um loop de 20 µL; 9) detetor de condutividade; 10) bomba peristáltica; 11) supressor químico; 12) coluna de separação; 13) computador.	33
Fig. 12 - Cromatograma representativo da gama de trabalho referente aos catiões nos 5 níveis de concentração. A preto estão representados os catiões do padrão 1, a vermelho o padrão 2, a verde o padrão 3, a amarelo o padrão 4 e a azul a solução padrão 5. Na vertical lemos a condutividade expressa em µS/cm e no eixo horizontal o tempo de corrida em minutos e, consequentemente, o tempo de retenção de cada catião.	36
Fig. 13 - Cromatograma representativo da gama de trabalho referente aos aniões nos 5 níveis de concentração. A preto estão representados os aniões referentes ao padrão 1, a vermelho o padrão 2, a verde o padrão 3, a amarelo o padrão 4 e a azul a solução padrão 5.	36
Fig. 14 – Representação do gráfico da curva de calibração do catião sódio.	38
Fig. 15 - Representação do gráfico da curva de calibração do anião fluoreto.	38

- Fig. 16 - Cromatograma obtido para a análise dos catiões da água da torneira. O eixo das ordenadas representa a área e o eixo das abscissas representa o tempo de retenção..... 46
- Fig. 17 - Cromatograma obtido para a análise dos aniões da água da torneira. O eixo das ordenadas representa a área e o eixo das abscissas representa o tempo de retenção..... 46

Lista de abreviaturas

CG	Cromatografia Gasosa
CI	Cromatografia Iônica
CV	Coeficiente de Variação
DMEA	Dimetiletanolamina
DS ²	Diferença de Variâncias
IR	Infravermelho
KF	Karl Fischer
LD	Limite Detecção
LQ	Limite Quantificação
MRC	Material Referência Certificado
NF	Nível Fortificação
NIR	Espectroscopia de Infravermelho Próximo
RSD	Desvio Padrão Relativo
TMA	Trimetilamina
VT	Valor Teste

I. Enquadramento

A M.T.Brandão, Lda. foi fundada em 1984 sendo a sua sede no Porto. A empresa dedica-se à importação e comercialização de equipamentos científicos e de controlo de qualidade, permitindo formação na utilização dos equipamentos, assegurando a sua manutenção e prestando assistência técnica aos seus clientes. A empresa está organizada nos seguintes departamentos: instrumentos de análise de laboratório e processo; lasers e optoelectrónica; imagem, teste e medida; caracterização e análise de materiais e espectroscopia, sendo que para cada uma destas áreas variam os fornecedores e os colaboradores internos, que se especializam de forma particular no seu segmento-alvo.

O estágio realizado teve como objetivo iniciar o laboratório de aplicações da empresa, onde foram realizados vários testes nos equipamentos disponíveis de acordo com as necessidades da entidade.

Este trabalho divide-se em 3 grandes partes. Na primeira parte refere-se a empresa de estágio, os objetivos e a organização do presente trabalho.

A segunda parte é relativa às aplicações práticas desenvolvidas durante o estágio. Está dividido em 3 componentes: a primeira refere-se à determinação do teor de água em etanol, através de Karl Fischer volumétrico; a segunda, à medição do teor de álcool no vinho, utilizando um *alcolyzer wine M*, um equipamento desenvolvido e patenteado pela Anton Paar para esta aplicação; a terceira à determinação de açúcares em sumos (°Brix), através de refratometria e densimetria.

A terceira parte do trabalho especifica a validação de uma metodologia para a determinação de iões inorgânicos (fluoreto, cloreto, nitrato, sulfato, fosfato, cálcio, sódio e magnésio), através do método de cromatografia iónica.

Apresenta-se uma componente (subcapítulo) a cada técnica. Dentro de cada subcapítulo está a introdução e pesquisa bibliográfica relativa ao tema, o procedimento experimental e os respetivos resultados e discussão.

II. Aplicações práticas

2.1. Determinação do teor de água em etanol

O etanol (C_2H_5OH), é um composto orgânico e pode ser obtido através da fermentação de açúcares. Esta substância é amplamente utilizada na indústria farmacêutica, cosmética, na indústria alimentar e na produção de combustíveis. Este álcool é completamente miscível em água e esta surge como uma impureza durante o processo de fabrico do etanol. Assim sendo, é importante conhecer o teor de água presente no etanol. Por exemplo, para que o etanol seja utilizado como biocombustível, o seu grau de pureza deve ser de 93%. [1]

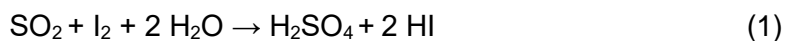
São alguns os métodos utilizados para determinar o teor de água em etanol como, por exemplo, métodos espectroscópicos (espectroscopia de infravermelho e infravermelho próximo) e pela técnica de condutividade elétrica. [2, 3] No entanto, a titulação por Karl Fischer (KF) é um método amplamente aplicado, uma vez que a diversidade de reagentes KF permite que estes reajam seletivamente com a água. Normalmente, a quantidade de água é expressa em % (m/m) ou g/kg.

Na titulação por KF, a amostra pode ser adicionada diretamente ao vaso de titulação e aí é dissolvida num solvente adequado. [3] Este método caracteriza-se por ser preciso, seletivo, abrange uma ampla gama de medição, utiliza pequenas quantidades de amostra e os resultados da análise são obtidos rapidamente. [4]

2.1.1. Karl Fischer

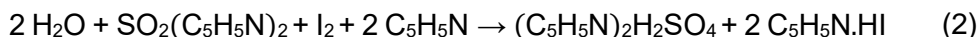
O método KF tem o nome do seu criador, o químico alemão Karl Fischer (1901-1958), que em 1935 publicou um método para determinar a quantidade de água em amostras [5]. Ao longo dos anos, este método foi automatizado e é um dos métodos mais utilizados para determinar o teor de água em amostras. [6]

Para desenvolver o seu novo método analítico, Karl Fischer teve em conta a reação de Bunsen: [7]



Esta reação (equação 1) pode ser utilizada na determinação de água, se o dióxido de enxofre estiver em excesso e se os ácidos produzidos forem neutralizados por uma base, neste caso, Karl Fischer, utilizou a piridina. Nestas condições, foi desenvolvida a

formulação do reagente clássico de Karl Fischer: uma solução de iodo e dióxido de enxofre numa mistura de piridina e metanol, que provou ser um solvente adequado. [8]



Smith, Bryant e Mitchell [9, 10], demonstraram que o metanol participava na reação, não sendo apenas solvente. Mais tarde, Verhoef e Barendrecht, concluíram que a piridina atua como agente tampão, podendo ser substituída por outra base que seja adequada (B). Sendo assim, a reação de KF em solução metanólica pode ser formulada como se segue (equação 3): [8, 10, 11]



A titulação KF deve ser executada na gama de pH entre os 5,5 a 8. Neste intervalo de pH, todo o SO_2 está presente como sulfito de metilo. Quando o pH é maior do que 8, ocorrem reações secundárias entre o iodo e o hidróxido ou iões de metilato, o que na prática vai resultar num ponto final mais lento e com maior consumo de iodo. O pH fora desta gama deve ser evitado e ajustado através da adição de agentes tampão. Por exemplo, para ácidos pode ser utilizado o imidazol e para bases o ácido salicílico. [10-12]

Para além do pH, o solvente orgânico e o teor de água na amostra também têm influência na reação de KF. A razão molar $1 \text{H}_2\text{O} : 1 \text{I}_2$, é afetada pelo tipo de solvente utilizado na titulação. Se o solvente for alcoólico (metanol, por exemplo), a razão molar é de 1:1, se o solvente for não alcoólico (por exemplo, dimetilformamida), a razão molar é de 2:1. O teor de água na amostra também afeta a estequiometria da reação. Se o teor de água for superior a 1 mol/L, são consumidos 2 mol de H_2O para um de I_2 ou um de SO_2 , favorecendo a reação de Bunsen para soluções aquosas. Para um volume grande de amostra, não é económico titular um teor de água elevado, e por isso, é necessário diluir a amostra e/ou utilizar uma pequena quantidade de amostra. [6, 8, 12]

Esta titulação é realizada através de duas técnicas: a titulação volumétrica de KF e a análise coulométrica KF. Na titulação volumétrica de KF, o iodo está presente no reagente KF e é adicionado durante a titulação através de uma bureta. Por outro lado, na titulação por análise coulométrica, o iodo é gerado electroquimicamente durante a titulação, através do iodeto contido no reagente de KF por eletrólise. As duas técnicas medem o ponto final, amperometricamente, através da deteção de iodo presente no meio. [13]

Para ambos os métodos, o reagente KF deve ser adicionado com precisão, exatidão e reprodutibilidade, tanto quanto possível. A célula de titulação deve ser o mais

impermeável possível, o vaso de titulação deve ser hermético e deve estar sempre sob agitação para que a água não adira às paredes do mesmo. [8, 12]

2.1.1.1. KF Volumétrico

Como já referido, na titulação volumétrica de KF (Figura 1), o iodo é adicionado durante a titulação através de uma bureta. As titulações volumétricas são normalmente utilizadas para determinar teores de água (absoluto) elevados, entre os 1000 ppm e 100%.

Com este método podem ser utilizadas amostras líquidas, sólidas ou pastosas que podem ser diretamente introduzidas no vaso de titulação. A grande variedade de solventes orgânicos existentes permite que o método seja aplicado a amostras bastantes distintas. [7]

Neste método, o solvente deve ser pré-titulado como branco e, em seguida, as amostras podem ser dissolvidas no solvente pré-titulado e tituladas com iodo para que seja determinado o teor de água.

Os reagentes para o KF em modo volumétrico, podem ser de um ou dois componentes. No reagente de um componente, o titulante contém iodo, dióxido de enxofre e imidazol dissolvidos em metanol. Este reagente é de manuseamento simples e é barato, no entanto, é pouco estável e a velocidade de titulação é mais lenta.

Reagentes KF de dois componentes têm uma solução de iodo e metanol, no titulante e o solvente contém enxofre, imidazol e metanol. Os reagentes KF de 2 componentes são muito estáveis e, conseqüentemente, o seu tempo de armazenamento é superior, desde que a garrafa esteja bem fechada. A velocidade de titulação é duas ou três vezes superior em relação ao reagente de um componente e garante um ponto final de titulação bem definido. [4, 8]

Até ao final dos anos 40, era utilizado um método de indicação visual ou fotométrico como método de deteção em KF. Este tipo de deteção só pode ser utilizado para soluções de amostras não coradas e dificilmente pode ser validado ou automatizado. Com o aparecimento dos métodos de indicação eletrométrica, este método caiu em desuso.

Os métodos de indicação eletrométrica utilizam dois elétrodos polarizáveis que, normalmente, são elétrodos duplos de fio de platina. Neste método, se a tensão aplicada for constante (máximo 500 mV), está-se perante um método de indicação

biamperométrica (Upol ou “*dead stop*”). Se a tensão aplicada entre os eletrodos for pequena, diz-se que é uma indicação bivoltamétrica (Ipol).

Os procedimentos eletrométricos são mais vantajosos, porque a titulação é sempre realizada com o mesmo (pequeno) excesso de iodo, permitindo que seja conseguida uma melhor reprodutibilidade e precisão. A titulação KF termina quando é detetado excesso de iodo na célula de titulação, ou seja, o ponto final é atingido se o potencial no eletrodo cair abaixo de um valor específico pré-definido. [6, 8, 12]



Fig. 1 - Karl Fischer volumétrico, Metrohm.
Fonte: Imagem retirada de [14]

2.1.2. Parte Experimental

2.1.2.1. Reagentes

Foram utilizados Hydranal® - Compósito 5 (Sigma-Aldrich) como agente de titulação, metanol (99,8%, Sigma-Aldrich) como solvente e meio de trabalho. A determinação do título foi feita com um padrão de água Hydranal®- *Water standard* 10.0 (Sigma-Aldrich) e água ultrapura (Fluka).

2.1.2.2. Material e equipamento

A titulação volumétrica de KF foi realizada utilizando um instrumento 836 Titrando (Metrohm, Switzerland), um agitador 803 Ti Stand (Metrohm, Switzerland) e uma bureta

automática de 20 mL, 800 Dosino (Metrohm, Switzerland). As amostras foram pesadas numa balança analítica Pioneer™, Ohaus®. Para a aquisição de dados, foi utilizado o *software* Tiamo™ 2.4.

Para introduzir as amostras no vaso de titulação, foram utilizadas seringas de plástico de 5 mL e agulhas de 0.8 mm.

2.1.2.3. Amostras

Para esta determinação foram utilizadas amostras de etanol, com diferentes concentrações: 99,9 %, 96 % (de duas marcas diferentes) e 70 %.

2.1.2.4. Preparação do sistema e do *drift*

Antes de iniciar a determinação, encheu-se o recipiente de titulação com solvente até que o eletrodo indicador e a ponta anti-difusão da bureta estivessem imersos no solvente. De seguida, preparou-se o método no *software* e inseriu-se a fórmula do padrão utilizado. Procedeu-se então à preparação do *drift*.

O *drift* é um valor que serve para definir as condições de partida, isto é, o valor da “humidade do ambiente” que o equipamento deteta (antes de introduzir a amostra). Através do *software*, uma mensagem informa que o sistema está pronto para a adição de amostra. Consequentemente, o valor do *drift* é utilizado no cálculo dos resultados, de forma a compensar a humidade que entrou no vaso de titulação. Para minimizar a influência do *drift*, o valor inicial medido pelo equipamento é multiplicado pelo tempo de determinação da titulação e, esse resultado, vai ser subtraído pelo teor de água da amostra, obtendo-se assim o resultado final sem a interferência da humidade atmosférica.

Em suma, o *drift* torna visível o consumo permanente de iodo durante a fase de condicionamento (secagem da célula de titulação antes da determinação da amostra), mas também durante a titulação, sendo importante para definir o seu fim.

2.1.2.5. Determinação do título

Para proceder à determinação do título, foi utilizada uma seringa e a respetiva agulha para aspirar o conteúdo da ampola que contem o padrão. Colocou-se a seringa com a agulha e o padrão na balança analítica e tarou-se. Iniciou-se a determinação, injetando

uma pequena quantidade de amostra no vaso de titulação. A amostra deve ser colocada dentro do vaso com a agulha e a seringa na posição vertical para que esta não vá diretamente para o eletrodo ou para a parede do recipiente de titulação. Depois de injetar o padrão, pesou-se novamente e colocou-se a diferença de massa no *software*. Repetiu-se o processo três vezes. O valor do título, em mg/mL, é calculado pelo software através da seguinte equação:

$$Título = \frac{m_{padrão} \times w_{padrão}}{V_{EP}} \quad (4)$$

onde a $m_{padrão}$ corresponde à massa de padrão introduzido no vaso de titulação, em gramas, o $w_{padrão}$ corresponde ao teor de água certificado do padrão, em mg/g, (esta informação está contida no rótulo, neste caso foi 10,02 mg/g) e o V_{EP} que representa a quantidade de titulante consumido em mL.

2.1.2.6. Procedimento para a determinação de água nas amostras de etanol

Antes de iniciar a análise, a célula de titulação tem que estar completamente seca. Esta célula é mantida seca por condicionamento, através da adição de iodo ao vaso de titulação.

As amostras de etanol foram recolhidas diretamente dos respetivos frascos com a ajuda de uma agulha e uma seringa. O conjunto da amostra, seringa e agulha foi pesado e tarado. Depois de verificar que o vaso de titulação estava sob agitação e que o *drift* estava OK (mensagem do *software*), a alíquota foi injetada dentro do vaso de titulação, o mais rápido possível, de modo a minimizar a influência da humidade atmosférica, enquanto o vaso está aberto. A amostra deve ser injetada com a seringa e a agulha na posição vertical para evitar que a amostra vá para as paredes do vaso. Foi injetada uma pequena porção de amostra até que a solução do vaso mude de cor (castanho para amarelo), fechou-se o vaso e a restante amostra dentro da seringa foi novamente pesada, por diferença. O equipamento inicia a titulação, assim que a amostra é colocada e o valor da massa é introduzido no *software*. Quando a titulação termina, os dados são guardados na base de dados do *software* e o equipamento condiciona o vaso de titulação, o valor do *drift* é novamente medido e quando este estiver estável, pode

injetar-se novamente amostra. O teor de água da amostra, em %, é calculado pelo *software* através da seguinte equação:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = \frac{V_{EP} \times \text{Título} \times 0,1}{m_{\text{amostra}}} \quad (5)$$

onde V_{EP} representa o volume de titulante consumido (mL), o valor do Título em mg/mL, 0,1 é o fator de conversão para % e m_{amostra} que corresponde à massa de amostra introduzida no vaso de titulação, em g.

2.1.3. Resultados e conclusões

Foram testadas amostras de etanol contendo entre 30 a 0,1 % de água. A amostra A contém 30 %, as amostras B e C contém 4 % e a amostra D 0,1 % (Tabela 1). Para cada amostra, foram realizadas 10 determinações à temperatura de 25 °C.

Para a amostra A foi obtido um valor médio de 35,2(2) % de humidade de água e com um desvio padrão absoluto (σ) de 0,8. As amostras B e C tiveram, respetivamente, um valor médio de teor de humidade de 5,70 e 5,30 % com desvios de 0,02 e 0,5. Por último, a amostra D teve uma média de 0,118 % com desvio padrão de 0,007.

Foi calculado o limite de repetibilidade (r) para as amostras. O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade, neste caso de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de idênticas (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo reagentes e em intervalos de tempo curtos).

Neste contexto, foram utilizadas a maior (X_{maior}) e menor (X_{menor}) determinações efetuadas em condições de repetibilidade com a seguinte condição: $|X_{\text{maior}} - X_{\text{menor}}| \leq r$. O valor de r foi determinado para um nível de confiança a 95%, através da seguinte equação 6:

$$r = t_{\text{tab}} \sqrt{2} \sigma \quad (6)$$

onde t_{tab} representa o valor de t de Student tabelado, neste caso para 9 graus de liberdade com 95% de confiança ($t_{\text{tab}} = 1,833$) e σ representa o desvio padrão obtido para as determinações consideradas, em condições de repetibilidade. [15]

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 2.

Tabela 1 - Resultados obtidos através de Karl Fischer Volumétrico para amostras de etanol, contendo diferentes teores de água, a temperatura de 25 °C. Na tabela, σ representa o desvio padrão absoluto e RSD representa o desvio padrão relativo em percentagem

Amostra A		Amostra B		Amostra C		Amostra D	
m_A / g	% H ₂ O	m_B / g	% H ₂ O	m_C / g	% H ₂ O	m_D / g	% H ₂ O
0,0149	36,229	0,4352	5,664	0,0168	5,940	1,1967	0,117
0,0178	36,040	0,3586	5,693	0,0327	5,325	1,0953	0,122
0,0158	34,526	0,3313	5,704	0,0216	4,884	0,7952	0,111
0,0209	34,468	0,3191	5,705	0,0181	5,408	1,2976	0,109
0,0198	36,383	0,3607	5,701	0,0241	4,536	1,3116	0,106
0,0203	35,721	0,3329	5,713	0,0365	6,341	0,9549	0,126
0,0216	34,671	0,3797	5,687	0,0379	4,689	1,0648	0,125
0,0221	34,711	0,2686	5,700	0,0221	5,289	1,2924	0,117
0,0231	34,531	0,3093	5,725	0,0223	5,341	0,9504	0,120
0,0179	34,936	0,300	5,731	0,0241	5,245	1,1105	0,122
\bar{x}	35,2(22)		5,70(2)		5,3(00)		0,118
σ	0,8		0,02		0,5		0,007
RSD	2		0,4		10		6

Tabela 2 - Resultados obtidos para o limite de repetibilidade (r) do método

Amostra	Máximo / %	Mínimo / %	máximo-mínimo	r	Conclusão
A	36,383	34,468	1,915	2,00	máximo-mínimo < r
B	5,731	5,664	0,067	0,052	máximo-mínimo > r
C	6,341	4,536	1,805	1,40	máximo-mínimo > r
D	0,126	0,106	0,020	0,020	máximo-mínimo = r

A amplitude dos resultados entre os dois ensaios para as amostras A e D, foram inferiores ou igual ao limite de repetibilidade, o que corresponde ao critério de aceitação. No entanto para as amostras B e C de etanol, o valor de r é inferior à amplitude dos ensaios, e por isso, os ensaios deveriam ser repetidos.

2.2. Medição do teor de álcool no vinho utilizando o Alcolyzer Wine M

O vinho resulta do processo de fermentação do mosto da uva através de leveduras, depois de sofrer processamento adequado. Os principais constituintes são a água e o etanol, seguidos dos açúcares, outros álcoois e compostos fenólicos, que no seu conjunto conferem aroma e cor ao vinho.

O teor de álcool, medido em percentagem por volume (% v/v), é um dos parâmetros mais determinados no vinho e para o qual, ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos métodos analíticos mais rápidos e precisos. Esta percentagem tornou-se obrigatória nos rótulos das garrafas das bebidas alcoólicas em toda a União Europeia e é um parâmetro importante para monitorizar a sua produção, controlo de qualidade e para estabelecer a base para o pagamento de impostos.

Um dos métodos mais utilizados para a determinação do teor de álcool no vinho é a destilação, porém é um procedimento demorado e que requer operadores com conhecimento e experiência. Outros métodos bastante utilizados são a cromatografia gasosa e a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) que têm as mesmas desvantagens relativamente à destilação e ainda o fato de envolverem calibrações elaboradas e serem equipamentos caros.

O *alcolyzer Wine M* baseado na espectroscopia NIR determina o teor de álcool de modo rápido, automático, podendo ser utilizado por qualquer pessoa, sem necessidade de uma calibração elaborada. [16, 17]

2.2.1. Espectroscopia de infravermelho próximo

A espectroscopia é uma técnica que utiliza radiação eletromagnética para analisar materiais através da transferência de energia entre a luz e a matéria. A espectroscopia de infravermelho (IR) baseia-se na interpretação de vibrações das ligações químicas da matéria, ou seja, nos níveis de energia da molécula (níveis vibracionais). Quando o momento dipolar da molécula varia, devido à sua vibração, a ligação química oscila e aparece no espectro, fornecendo dados que permitem conhecer propriedades físicas e químicas das amostras. Estas vibrações das ligações moleculares aparecem nas gamas espectrais entre 14000 a 4000 cm^{-1} (infravermelho próximo, NIR), 4000 e 400 cm^{-1} (infravermelho médio) e 400 a 10 cm^{-1} (infravermelho distante). [18]

O espectro NIR é caracterizado por produzir bandas de absorção conhecidas por harmónicos complexos e bandas de combinação das vibrações fundamentais. Os harmónicos complexos acontecem quando a molécula faz uma transição para estados vibracionais não contíguos, enquanto que as bandas de combinação ocorrem em moléculas poliatómicas, quando dois ou mais modos vibratórios interagem de forma a provocar mudanças simultâneas de energia, dando assim origem a estas bandas de absorção. [19] Estas faixas aparecem entre 780 nm e 2000 nm, dependendo da ordem do harmónico, da natureza e resistência da ligação (Figura 2).

O modelo do oscilador harmónico descreve a vibração das moléculas diatómicas nos níveis de energia contíguos, igualmente espaçados, através da seguinte equação:

$$E_{\text{vib}} = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (7)$$

em que,

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (8)$$

Na equação 7, ν é o numero quântico vibracional, h a constante de Plank, k a constante de força e μ a massa reduzida das ligações atómicas. A massa reduzida é obtida através da equação 8 em que m_1 e m_2 representam a massa dos átomos presentes na ligação.

Posto isto, a energia que é absorvida para promover a molécula para um nível excitado é calculada a partir da diferença entre dois níveis de energia adjacentes:

$$\Delta E = E_{\nu 2} - E_{\nu 1} = \Delta \nu h \nu \quad (9)$$

em que $\Delta \nu = 1$ e representa a restrição imposta pelo modelo harmónico de que as transições apenas ocorrem entre os níveis adjacentes e ν representa a frequência de vibração dada pela equação 10.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (10)$$

No entanto este modelo não é realista, uma vez que pode ocorrer a quebra de ligação na molécula, dissociando-a. Assim, o modelo anarmónico admite que podem ocorrer

transições entre níveis não contíguos (sobreposições) e transições que envolvam duas vibrações diferentes (combinações).

A figura 2, mostra que as distâncias em cada nível vibracional são diferentes para cada uma das funções. No oscilador harmónico a distância permanece igual nos diferentes estados excitados da molécula, enquanto que, no modelo anarmónico a distância tende a decrescer com o aumento da energia potencial. Para além disso, o modelo anarmónico prevê ainda que, com o aumento da distância nuclear entre os dois átomos, a molécula se dissocia. [19, 20]

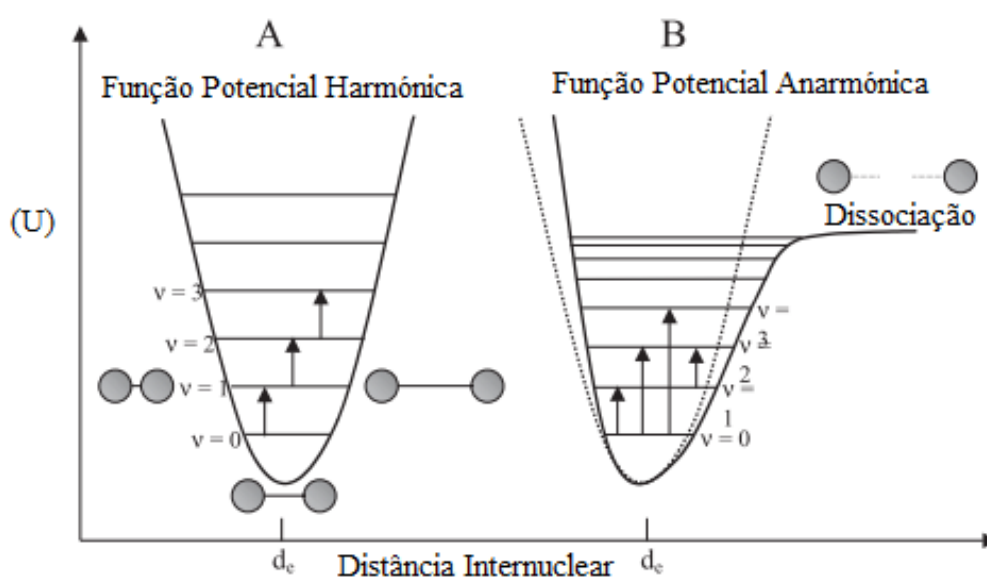


Fig. 2 - Representação do oscilador harmónico (A) e do oscilador anarmónico (B) para a energia potencial (U) de moléculas diatómicas.

Fonte: imagem adaptada de [20]

No caso das moléculas poliatómicas, dois ou mais modos de vibração podem interagir de modo a provocar alterações de energia e dar origem às bandas de absorção de combinação, cuja frequência é o somatório de cada frequência de interação. Estas combinações ocorrem entre os 1900 e os 2500 nm (Figura 3).

As bandas de absorção mais proeminentes são relativas às bandas das vibrações moleculares fundamentais dos grupos funcionais C-H, N-H, O-H e S-H, que devido à presença do átomo de H, átomo leve, vibram com mais intensidade. Estas bandas de absorção são amplas, ficando mais fortes, mais nítidas e com melhor resolução quanto mais longo for o comprimento de onda a que ocorrem. [21]

Para além de conter a composição química da amostra, os espectros NIR também contêm informação acerca de propriedades físicas relacionadas com a matriz. Por exemplo, as diferenças de tamanho de partícula vão fazer com que haja deslocamento da linha de base ou quanto maiores forem as partículas, maior é a penetração da luz e maior será absorvância. [21]

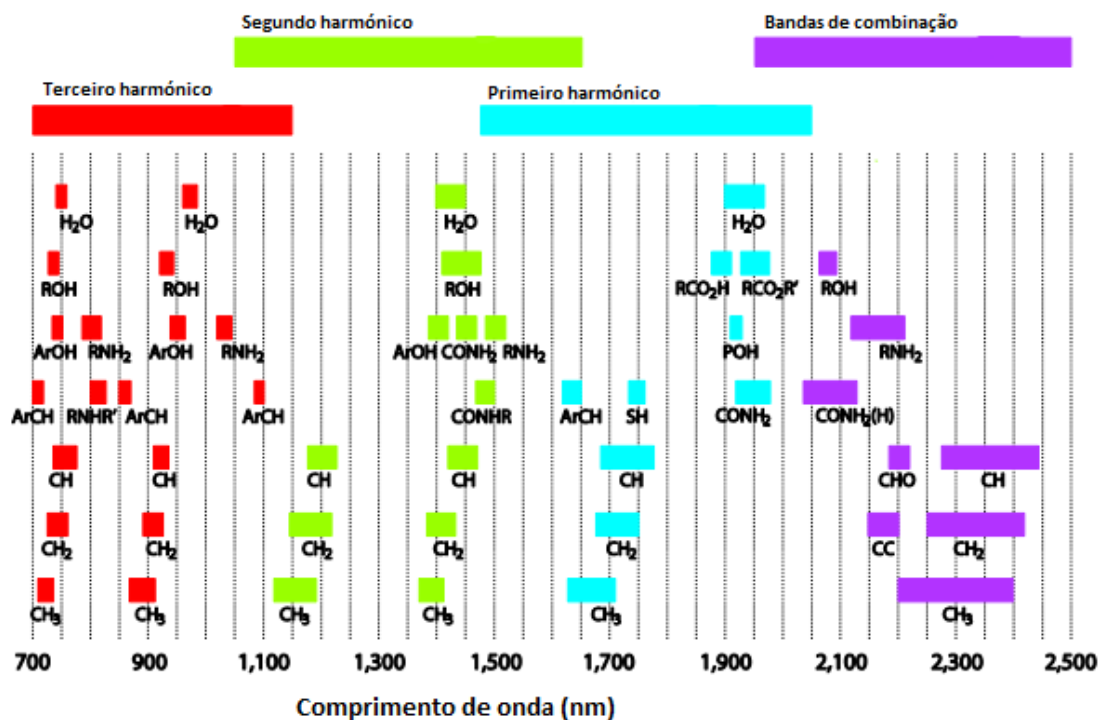


Fig. 3 - Posição dos principais picos relativos às bandas de absorção no NIR. Entre os 700 nm e os 1900 nm estão representados os níveis de harmónicos e dos 1900 aos 2500 nm estão representadas as bandas de combinação.

Fonte: imagem retirada e adaptada de [21]

2.2.1.1. Alcolyzer Wine M

O *Alcolyzer Wine M* (Figura 4) é um equipamento patenteado da Anton Paar, que aplica a espectroscopia NIR para a determinação do teor de álcool em bebidas, neste caso vinho.

A marca desenvolveu um espectrómetro de alta resolução e seletivo, que ao medir a absorção da luz num comprimento de onda muito específico, permite a determinação de álcool e não é influenciado pelos outros ingredientes da composição da amostra. O teor de etanol na bebida, pode ser diretamente relacionado com a absorção medida.



Fig. 4 - Alcolyzer Wine M da Anton Paar.

Fonte: imagem retirada de [22]

O equipamento mede o teor de álcool em % v/v numa gama dos 0 aos 20 % de álcool.

Este método de medição é facilmente calibrado com água e uma solução de álcool e água. [23]

2.2.2. Parte experimental

2.2.2.1. Reagentes

Água ultrapura (Sigma Aldrich) e etanol (99,9%, Scharlau).

2.2.2.2. Material e Equipamento

Alcolyzer Wine M da marca Anton Paar, para a análise das amostras. Para fazer a injeção, foram utilizadas seringas de 5 mL.

2.2.2.3. Amostras

Neste trabalho, foram analisadas amostras de vinhos. Dois vinhos tintos com 10 e 14 % de álcool e um vinho branco com 11% de álcool (valores do rótulo).

2.2.2.4. Calibração do equipamento

Antes de proceder às medições o equipamento foi limpo e calibrado. Para limpar o Alcolyzer, foi utilizada água ultrapura que foi passada na célula por 5 vezes.

De seguida, procedeu-se à medição com água para o ajusto do zero e, por fim, foi medida uma solução com 10 % de etanol, preparada no laboratório.

2.2.2.5. Medição das amostras de vinho

Não foi necessária preparação das amostras de vinho, uma vez que estas não continham gás e não se verificou formação de bolhas. As amostras foram injetadas no equipamento com uma seringa de plástico de 5 mL, volume necessário para preencher a célula de medição, sem bolhas de ar. A seringa ficou no adaptador até que a medição terminasse. A garrafa de vinho foi imediatamente coberta com a tampa, para tentar evitar perdas de álcool. As medições foram efetuadas a uma temperatura de cerca de 20 °C.

No final, voltou-se a lavar o equipamento com água ultrapura, para evitar contaminações.

2.2.3. Resultados e conclusões

Foram analisadas 3 amostras de vinho com diferentes graus de etanol, em 3 dias diferentes.

Foi injetado cerca de 5 mL de vinho com uma seringa. Cada medição demorou cerca de 3 minutos e foram efetuadas 14 medições para cada vinho.

A tabela 3 mostra os resultados obtidos.

No vinho tinto com 10 % de álcool verificam-se algumas perdas de álcool durante o tempo em que decorreu a análise. Os valores médios foram o esperado e concordantes com o rótulo. O método obteve boa precisão com desvios padrão de 0,03 e 0,02.

Ao manusear amostras que contém álcool, é necessário cobrir os frascos das amostras para tentar evitar a sua evaporação. O ideal seria manter as amostras e a temperatura ambiente a 20 °C e, neste caso, não foi possível controlar o fator temperatura nem ambiente, nem da amostra, aumentando assim a probabilidade de evaporação do álcool.

Tabela 3 - Medições para as amostras de vinho tinto e branco a 20 °C, aproximadamente

	Vinho tinto 1	Vinho tinto 2	Vinho branco
	% álcool	% álcool	% álcool
	9,57	13,78	10,72
	9,58	13,78	10,72
	9,58	13,75	10,76
	9,59	13,78	10,76
	9,58	13,76	10,73
	9,57	13,76	10,72
	9,57	13,76	10,71
	9,56	13,76	10,69
	9,55	13,73	10,72
	9,55	13,79	10,73
	9,53	13,79	10,72
	9,52	13,76	10,73
	9,50	13,76	10,72
	9,48	13,76	10,72
\bar{x}	9,55	13,77	10,73
σ	0,03	0,02	0,02

2.3. Determinação do teor de açúcares em sumos

O aumento da produção e consumo de sumos de fruta exige que métodos de controle sejam capazes de determinar o seu teor de açúcar para que essa informação conste de forma transparente e adequada nas embalagens. Um dos parâmetros que deve ser medido é o teor de açúcares, para que conste nas informações nutricionais e calóricas do produto, que podem ser especialmente importantes para pessoas diabéticas. [24]

Sumos de fruta, refrigerantes, néctares ou concentrados de fruta, são maioritariamente constituídos por água e açúcar, como por exemplo, a sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), que confere o sabor doce à bebida. Estes hidratos de carbono, podem ser simples (monossacarídeos) ou complexos (dois ou mais monossacarídeos ligados entre si). Se a estrutura do açúcar for composta por apenas dois monossacarídeos ligados entre si, são classificados como dissacarídeos (por exemplo: glicose, frutose ou galactose); se forem constituídos por três a dez monossacarídeos ligados entre si, denominam-se oligossacarídeos; se resultarem da ligação glicosídica com mais de dez monossacarídeos, são classificados como polissacarídeos, caso do amido.

O teor de açúcar presente nas bebidas pode ser determinado através de diversas técnicas como a espectroscopia de infravermelho, refratometria e densitometria. [25, 26]

É utilizado o termo “Brix” para expressar o teor de açúcares numa solução. A unidade de medida é o grau (°) e 1° Brix representa 1 g de açúcares totais em cada 100 g de amostra. [27]

2.3.1. Refratometria

Quando a luz passa de um meio para outro, com diferentes índices de refração, é submetida a um fenómeno refrativo (Figura 5). A mudança do meio é medida em graus e permite determinar o ângulo de refração.

O índice de refração (n_i) relaciona a velocidade da luz no vácuo ($c = 3,00 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$) com a velocidade da luz num determinado meio (v_i), através da equação 11:

$$n_i = \frac{c}{v_i} \quad (11)$$

Através da Lei de Snell (equação 12), é possível determinar os ângulos de incidência (Θ_1) e de refração (Θ_2) dos dois meios (n_1 e n_2):

$$n_1 \sin \Theta_1 = n_2 \sin \Theta_2 \quad (12)$$

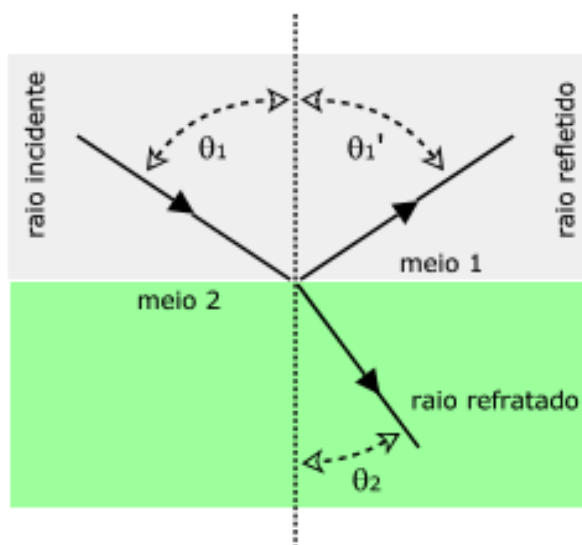


Fig. 5 - Refração da luz em dois meios diferentes e refletância no mesmo meio.

Fonte: imagem retirada e adaptada de [26]

Esse fenómeno é medido experimentalmente de forma automática, através de um equipamento que se denomina por refratómetro. Neste contexto, uma alíquota da amostra é colocada diretamente no prisma do equipamento e fechado. Uma fonte de luz, geralmente LED, atravessa um sistema de lentes, o prisma e a amostra que é atravessada pela luz por diversos ângulos. Um filtro colocado logo a seguir à fonte de luz garante que o comprimento de onda é o especificado. A medição do índice refrativo da amostra é determinada através do ângulo crítico da reflexão total. Dependendo da diferença entre o índice de refração entre a amostra e o prisma, a luz é parcialmente transmitida ou totalmente refletida. O esquema da Figura 6, mostra a configuração de um refratómetro automático. [28, 29]

O índice de refração da amostra depende do comprimento de onda a que é sujeita e da sua temperatura e, por isso, estes dois fatores devem ser controlados com elevada precisão. Na literatura, a temperatura a que o índice de refração é medido, designa-se pela letra n e a letra D representa o comprimento de onda de 589,3 nm, também chamado por “D de sódio”. Sendo assim, n_D^{20} representa a temperatura de 20 °C e o comprimento de onda de 589,3 nm. [28]

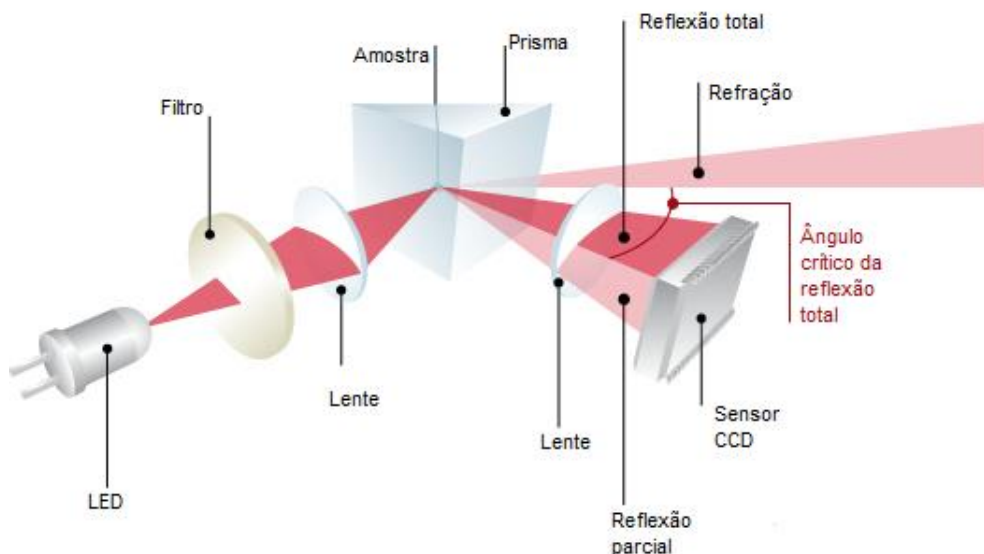


Fig. 6 - Esquema de configuração de um refratômetro automático.

Fonte: Imagem retirada e adaptada de [30]

2.3.2. Parte experimental

2.3.2.1. Material e Equipamento

As leituras foram efetuadas com o refratômetro Abbemat 200 da marca Anton Paar e com um densímetro DMA 35 da marca Anton Paar.

2.3.2.2. Amostras

Foram utilizadas duas amostras de sumos de pera e de pêssgo, com 50% de fruta.

2.3.2.3. Medição

Antes de iniciar a medição, foram feitas 3 leituras com água ultrapura no equipamento.

Na refratometria, os sumos foram agitados, para homogeneizar a polpa e foram retiradas alíquotas de amostra com uma seringa de plástico. Foram colocados alguns mililitros de amostra no prisma, a tampa foi fechada e procedeu-se às leituras. Foram feitas 10 leituras para cada sumo. Entre as medições de cada amostra, a célula foi limpa com papel e água ultrapura. As determinações foram feitas a 20 °C, num comprimento de onda de 589,3 nm.

No densímetro, a amostra foi retirada diretamente do frasco para o equipamento, à temperatura ambiente e após agitação do sumo. Cada amostra foi lida 10 vezes.



Fig. 7 - Refratômetro Abbemat 200.
Fonte: imagem retirada de [31]



Fig. 8 - Densímetro DMA 35.
Fonte: imagem retirada de [32]

2.3.3. Resultados e conclusões

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para os dez ensaios resultantes da refratometria. Para uma melhor compreensão, é apresentada a média (\bar{x}) e o desvio padrão absoluto (σ).

Para o sumo de pêssgo foi obtido uma média e desvio padrão de $11,7 \pm 0$ °Brix. Isto significa que o sumo analisado contem 11,7 g de açúcares por 100 g de amostra. Para o sumo de pera foi obtido um resultado médio de $11,9 \pm 0$ °Brix, tendo presente na sua composição 11,9 g de açúcar por cada 100 g. O índice de refração obtido com este método para os sumos de pêssgo e pera, foi de 1,3499 e 1,3491, respetivamente.

Tabela 4 - Resultados obtidos para os sumos de pêssgo e pera através do método refratométrico

	Sumo de pêssgo		Sumo de pera	
	° Brix	IR / nD	° Brix	IR / nD
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
	11,70	1,3499	11,19	1,3491
\bar{x}	11,70		11,19	
σ	0		0	

Para os ensaios efetuados no densímetro (Tabela 5), foi verificado que a média de °Brix e o respetivo desvio padrão foram de $11,94 \pm 0,17$ °Brix para o sumo de pêssgo e $11,84 \pm 0,07$ °Brix para o néctar de pera. Este método mostrou-se menos preciso do que o anterior.

Tabela 5 - Resultados obtidos para as amostras de sumos de pera e pêssgo através do densímetro

	Sumo de pêssgo	Sumo de pera
	° Brix	° Brix
	11,5	11,8
	11,9	11,9
	12,0	11,7
	12,0	11,9
	12,0	11,9
	12,0	11,8
	12,0	11,8
	12,0	11,8
	12,0	11,9
	12,0	11,9
\bar{x}	11,9	11,4
σ	0,2	0,1
RSD	1	0,6

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados a partir de um teste t para as médias emparelhadas. Este teste comparativo, tem como objetivo estudar a exatidão dos resultados provenientes dos métodos em estudo para amostras iguais ou semelhantes, com número de ensaios iguais.

Posto isto, o teste pressupõe a comparação de um valor t experimental (t_{exp}) e um valor t tabelado (t_{tab}), para um determinado grau de confiança e graus de liberdade $n-1$.

Primeiramente, foram calculadas as diferenças entre os resultados emparelhados para os dois métodos de cada amostra e, a partir daí, foram calculadas as médias aritméticas dessas diferenças (D_m). Com este valor foi possível obter o valor do t_{exp} , através da equação:

$$t_{\text{exp}} = \frac{D_m}{\sigma_m} \sqrt{n} \quad (13)$$

onde σ_m representa o desvio padrão associado à média das diferenças e n o número de determinações. A tabela 6 mostra os resultados obtidos para este teste.

Tabela 6 - Resultados obtidos para o teste t de médias emparelhadas determinados pelos dois métodos em estudo para as amostras de sumo de pera e pêssego

	$D_m / ^\circ\text{Brix}$	$\sigma_m / ^\circ\text{Brix}$	$t_{\text{tab}(0,95;9)}$	t_{exp}	Conclusão
Sumo pêssego	0,24	0,166	1,833	4,58	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$
Sumo pera	0,65	0,071		29,07	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$

Através da análise da tabela 6 é possível concluir que o valor experimental de t é superior ao valor tabelado, num nível de confiança de 95% para 9 graus de liberdade. Este resultado verificou-se para os dois tipos de sumo. Isto mostra, estatisticamente, que os resultados resultantes dos dois métodos apresentam desvios, o que já se esperava, dada a natureza muito diferente dos instrumentos.

Em suma, a refratometria mostrou ser um método bastante preciso e com valores exatos para determinar o teor de açúcares para os sumos em estudo.

III. Validação de metodologia para a determinação de iões inorgânicos em águas para consumo humano

3.1. Iões inorgânicos na água para consumo humano

Entende-se por água potável aquela que é de boa qualidade, ou seja, isenta de impurezas prejudiciais como bactérias, vírus, substâncias orgânicas e inorgânicas e que, portanto, pode ser consumida na quantidade desejada sem acarretar malefícios para a saúde. [33]

Em Portugal, o Decreto-Lei 236/98 “estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos”. A água destinada ao consumo humano, é proveniente de águas superficiais ou subterrâneas e tem associadas normas de qualidade e parâmetros preventivos para os iões inorgânicos mais comuns através do decreto-lei 236/98 e da diretiva 98/83/CE, para proteger a saúde pública e promover a sua utilização sustentável. [34, 35]

A concentração do ião fluoreto nas águas subterrâneas é muito variável, dependendo da natureza das rochas e da ocorrência de minerais. São esperadas elevadas concentrações de flúor em aquíferos pobres em cálcio. Se presente em concentrações baixas na água potável, este anião tem efeitos positivos, pois previne as cáries dentárias. No entanto, se a exposição a este ião for elevada, pode provocar efeitos negativos nos ossos e dentes e, em casos extremos, poderá levar à morte. No nosso país, o nível recomendado deste anião na água para consumo é de 0,7-1,0 mg/L, no entanto o Decreto-Lei 236/98 prevê ainda um valor máximo admissível de 1,5 mg/L. [35, 36]

A quantidade admissível de sulfato e cloreto na água potável é de 250 mg/L. A ingestão de água potável com concentrações de sulfato superiores a 500 mg/L, pode ter efeitos gastrointestinais indesejados. O cloreto, por sua vez, interfere no sabor da água. O cloreto na água potável provém de fontes naturais, esgotos e efluentes industriais. [34, 37]

A presença do anião nitrato na água para consumo humano, não deve exceder os 0,50 mg/L. Este anião, aparece em baixa concentração tanto nas águas subterrâneas como superficiais, no entanto, o escoamento proveniente de terras agrícolas e resíduos humanos podem levar ao aumento da sua concentração. A “síndrome do bebé-azul” ou

meta-hemoglobinemia é uma das principais preocupações em caso de ingestão de água com elevado teor de nitratos. O nitrato é reduzido a anião nitrito e este oxida a hemoglobina em meta-hemoglobina, que é incapaz de transportar oxigénio. [37]

As descargas industriais, urbanas, resíduos oriundos da atividade agrícola e pecuária são as fontes que contribuem para a acumulação de fósforo nos solos, águas superficiais e lençóis de água. Dissolvidos no meio aquático, estes compostos são responsáveis pelo crescimento excessivo de plantas aquáticas (eutrofização), afetando assim as características normais e desejáveis da água. O valor máximo recomendável do anião fosfato para consumo na água é de 0,4 mg/L. [34, 38]

O magnésio e o cálcio determinam a dureza da água. Os valores paramétricos para estes dois catiões são de 50 e 100 mg/L, respetivamente. Nos últimos anos, a dureza da água, provocada pela concentração elevada destes iões, tem sido relacionada com diversas doenças cardiovasculares. [39]

Os sais de sódio estão presentes praticamente em todos os alimentos e água que ingerimos. Não são conhecidos efeitos negativos para saúde, através da ingestão de água. No entanto, este catião altera o seu sabor e, por conseguinte, o seu valor paramétrico na água para consumo é de 150 mg/L. [34, 37]

3.2. Cromatografia iónica

A cromatografia é um método físico-químico que permite separar misturas de substâncias através da distribuição entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A fase móvel ou eluente arrasta a amostra para uma fase estacionária que está fixa numa superfície sólida, onde os analitos são retidos de acordo com a sua afinidade. Os analitos com menor afinidade ao eluente vão ser retidos mais tarde e têm maior afinidade à fase estacionária. Pelo contrário, os analitos com maior afinidade à fase estacionária, vão ser eluídos em primeiro lugar pois movem-se mais rapidamente no eluente. À medida que os compostos são separados na fase estacionária, vão sendo detetados e dão origem a picos cromatográficos, que dependem da característica do analito e das condições de trabalho, que por fim dão origem a um cromatograma, onde é representado o sinal em função do tempo. [40]

O termo “cromatografia iónica” (CI) introduzido em 1975 por Small, Stevens e Baumann como um novo método analítico. [41] Este método permite separar e determinar solutos iónicos orgânicos e inorgânicos.

Este método baseia-se numa reação química estequiométrica entre os grupos funcionais contidos na coluna, que devido a forças eletrostáticas, fixam os iões de uma determinada substância. Este processo exige uma condição de equilíbrio, que depende da afinidade dos iões participantes em relação aos grupos funcionais que estão inseridos na fase estacionária. Isto resulta no seguinte equilíbrio, para os aniões:



M^+E^- representa o permutador iónico que contém o M^+ (ião fixo positivo) e, quando uma solução contém um anião diferente, neste caso A^- , é estabelecido o contacto com o permutador iónico. Ocorre, então, o equilíbrio entre os iões móveis que são E^- (ião do eluente ou contra-ião) e A^- (ião da amostra). Os permutadores podem ser de troca catiónica, em que o ião fixo terá carga negativa ou de troca aniónica, em que o ião fixo terá carga positiva. [40, 42]

Na CI, a fase estacionária é composta por partículas esféricas muito pequenas de diâmetro compreendido entre os 2 e os 10 μm . Normalmente, são compostas por resinas poliméricas organicamente modificadas ou sílica gel carregadas com grupos funcionais, que permitem a troca iónica. No caso de ser aplicada para a determinação de aniões, são utilizadas aminas fixas na superfície do polímero, uma vez que estas apresentam grande estabilidade química e permite que sejam formados um grande número de substituintes diferentes a partir do átomo de azoto. No entanto, o permutador aniónico deve ser constituído por grupos amónio quaternário, para garantir elevada basicidade, impedir que estes sejam desprotonados pelo eluente e percam a capacidade de carga. Os derivados da trimetilamina (TMA) e dimetiletanolamina (DMEA) são os mais utilizados. Para determinar catiões, o mais comum é ser utilizada uma matriz de estireno-divinilbenzeno ou sílica gel com grupos de ácido sulfónico, permitindo assim, trabalhar em toda a gama de pH. [40]

A fase móvel utilizada na CI, consiste numa solução aquosa constituída por um sal ou uma mistura de sais, podendo ser adicionado também um solvente orgânico. As características a ter em conta no eluente, pois afetam a sua capacidade de eluição, são: o pH, a natureza do ião eluente, a concentração do ião eluente, a sua compatibilidade com o método de deteção e capacidade de tamponamento. É importante, também, adequar o eluente em função da utilização de supressor ou não na técnica utilizada.

O sistema de deteção utilizado neste tipo de cromatografia deve apresentar alta sensibilidade de medição, o tempo de resposta deve ser rápido, ser suscetível a pequenas mudanças na linha de base e ter baixo ruído de fundo. Há vários sistemas de

deteção que podem ser utilizados neste método: amperométrico, espectrométricos, de fluorescência, deteção por índice de refração e condutividade.

Quando a coluna de separação está ligada diretamente ao detetor, diz-se que a técnica é não suprimida. O eluente sai da coluna e não é alterado quimicamente (Figura 9).

No caso da CI suprimida (Figura 10), é inserido um supressor entre a coluna e o detetor, alterando quimicamente o eluente. Este procedimento tem como função reduzir a condutividade de fundo do eluente, aumentando a deteção dos analitos e a sensibilidade do método. Nesta situação, devem ser utilizados eluentes à base de carbonato e bicarbonato, evitando que a solução não seja protonada após a reação de supressão, o que poderia tornar a detetabilidade da técnica inferior quando comparada com o caso de ausência de supressão. A técnica de supressão é utilizada para a deteção de analitos aniónicos. [40, 42]

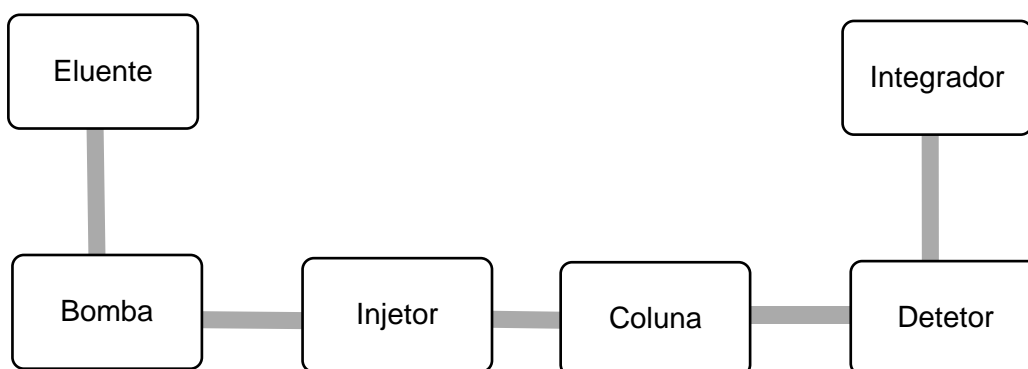


Fig. 9 - Diagrama dos componentes instrumentais de cromatografia iónica não suprimida.

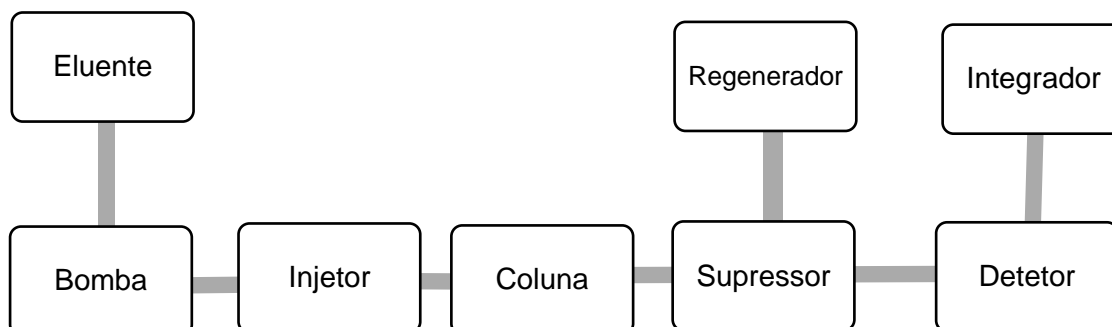


Fig. 10 - Diagrama dos componentes instrumentais da cromatografia iónica suprimida.

Para a determinação de iões comumente presentes nas águas de consumo humano, como o cloreto, fluoreto, nitrato, sulfato, cálcio, sódio, a cromatografia iónica apresenta-se como um método rápido, que não necessita de reagentes perigosos, barato e que permite a análise de vários aniões e de vários catiões, em pouco tempo.

3.3. Validação do método analítico

A validação de um método analítico é, segundo a norma ISO/IEC 17025, “uma confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional”, ou seja, garantir que um determinado método responde de maneira apropriada, evitando resultados duvidosos que podem levar a consequências indesejadas. Esta avaliação afere a eficiência de um laboratório, tanto para validar um método que tenha sido desenvolvido dentro do mesmo como para verificar se um método adaptado de outras fontes está a ser bem aplicado. [43]

Os métodos de ensaio envolvem operações que acumulam erros sistemáticos e aleatórios, afetando o resultado final. Por isso, é necessário que os laboratórios possam demonstrar que os resultados obtidos são fiáveis, a partir da validação do método interno que adotam. Para isso, é necessário proceder ao estudo de vários parâmetros relevantes na análise quantitativa.

Para a validação de um método interno é necessário proceder à análise quantitativa do método e, para isso, é necessário determinar parâmetros como: a gama de trabalho, a sensibilidade, a precisão, a exatidão e os limiares analíticos. [15]

3.3.1. Seletividade

A seletividade é a primeira etapa na validação de um método instrumental de separação. A seletividade permite verificar a separação na presença de componentes que podem interferir com a determinação do(s) analito(s) em estudo na matriz da amostra, isto é, garante que o pico é apenas do analito em interesse. Caso não se verifique a seletividade do método, a linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidas. [43]

3.3.2. Linearidade e gama de trabalho

A capacidade que o método tem de fornecer resposta diretamente proporcional numa determinada gama de trabalho é denominada linearidade. [44]

A gama de trabalho de um método corresponde ao intervalo de concentrações no qual o analito pode ser determinado com exatidão, precisão e linearidade. Pela equação da reta $y = mx + b$, é possível estudar a relação entre o sinal e a concentração do analito e, a partir do cálculo do coeficiente de determinação (R^2), obtém-se informação sobre a qualidade do ajuste da reta. Quanto mais próximo de 1,0 for o valor de R^2 , menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais (que, na prática, devem ser pelos menos 5 pontos) e menor é a incerteza associada. [43] Dependendo do método analítico, as curvas de calibração, devem ter valores de R^2 superiores a 0,995. [15]

A gama de trabalho deve ser avaliada a partir do estudo de homogeneidade de variâncias.

A homogeneidade das variâncias é a comparação estatística da variância do padrão mais concentrado da curva (s^2_M) com a variância do padrão menos concentrado (s^2_m), através do teste de Fischer.

$$F_{\text{exp}} = \frac{(s^2_M)}{(s^2_m)} \text{ para } (s^2_M) > (s^2_m) \quad (15)$$

Este valor de Fischer experimental (F_{exp}) é comparado com o valor tabelado da distribuição de Fischer (F_{crit}). Se o $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{crit}}$, podemos concluir que a diferença entre as variâncias não é significativa; caso o $F_{\text{exp}} > F_{\text{crit}}$, então a diferença entre as variâncias é significativa e a gama de trabalho deve ser reduzida para que se verifique homogeneidade. [15, 45]

Para verificar a linearidade do método é necessário recorrer a testes estatísticos. O teste utilizado nesta validação é o teste de Mandel. Neste teste, é possível verificar se se aplica uma função de calibração linear ou não linear (polinomial de 2º grau), aos pontos da curva de calibração, comparando um valor teste com o valor do teste de Fisher.

Primeiramente, é necessário calcular os respetivos desvios padrão residuais, $s_{y/x(1)}$ e $s_{x/y(2)}$, a partir do conjunto de resultados obtidos experimentalmente para os padrões de calibração. Para isso, aplica-se as equações:

$$s_{y/x(1)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-2}} \quad (16)$$

$$s_{y/x(2)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N-3}} \quad (17)$$

onde N representa o número de padrões de calibração, y_i o sinal obtido para um padrão de uma determinada concentração e \bar{y}_i e \bar{y}_{i2} o sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração.

Com os valores dos desvios padrão residuais é possível calcular a diferença de variâncias (DS^2) através da seguinte equação:

$$DS^2 = (N-2) \cdot s_{y/x(1)}^2 - (N-3) \cdot s_{y/x(2)}^2 \quad (18)$$

A partir daqui, obtêm-se o valor teste (VT), que posteriormente é comparado com o valor tabelado de Fisher, para um determinado grau de confiança.

$$VT = \frac{DS^2}{s_{y/x(2)}^2} \quad (19)$$

Se o VT for menor ou igual que o valor de F, a função de calibração diz-se linear. Se VT for maior do que F, então, a função de calibração é não linear e a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível. [45, 46]

3.3.3. Precisão

A dispersão entre resultados de medidas independentes, define a precisão do método. Este processo é repetido em diversas amostras, sob condições definidas que devem ser as mesmas. A precisão é expressa através do desvio padrão absoluto (σ) ou pelo desvio padrão relativo, também conhecido por coeficiente de variação (CV).

O desvio padrão absoluto (σ) é representado pela expressão 20:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (20)$$

em que \bar{x} é a média das determinações, x_i é o valor individual de uma medição e n é o número total de medições.

O CV pode é expresso por (equação 21):

$$CV (\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 \quad (21)$$

Segundo a lei empírica de Horwitz, existe uma relação exponencial entre o nível de concentrações e a respetiva precisão, ou seja, a incerteza de uma concentração varia com o nível de concentração do analito na amostra, definido pela equação:

$$CV (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (22)$$

em que C representa a concentração do analito. Para amostras na ordem dos mg/L (ppm), são aceites CV de 20 %. [47]

A precisão da metodologia pode ser avaliada a partir da repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

A repetibilidade expressa a precisão a partir de ensaios, efetuados sobre a mesma amostra e realizados em condições idênticas: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e num curto intervalo de tempo. A repetibilidade pode ser expressa a partir do desvio padrão relativo.

A precisão intermédia avalia o efeito de variações dentro do mesmo laboratório como, por exemplo, a análise de alíquotas em diferentes dias ou por diferentes analistas ou até diferentes equipamentos, com o objetivo de verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados quando submetido a condições diferentes. Esta medida de precisão também pode ser expressa através do coeficiente de variação.

Por último, a reprodutibilidade refere o efeito de variações entre os resultados das medições de uma mesma amostra submetida a condições variadas como a mudança de operador, laboratório e equipamentos. A IUPAC aconselha que o estudo de reprodutibilidade seja elaborado em pelo menos cinco laboratórios diferentes. O estudo da precisão ao nível da reprodutibilidade deve incluir a estimativa do desvio padrão absoluto e relativo.

Neste trabalho a avaliação da precisão foi feita apenas em condições de precisão intermédia, pois é a reconhecida como sendo a mais representativa da variabilidade de resultados dentro do laboratório. [15, 43]

3.3.4. Exatidão

O estudo da exatidão é definido como sendo a concordância entre o valor obtido pelo método em estudo e um valor de referência aceite como verdadeiro.

A exatidão pode ser avaliada através de um material de referência certificado (MRC), comparando os resultados de dois ou mais métodos analíticos (interlaboratoriais ou intralaboratoriais) ou através de ensaios de recuperação, também chamados de ensaios de fortificação. Estes últimos são os mais utilizados, uma vez que os MRC são caros e a comparação de ensaios interlaboratoriais nem sempre é possível. [48]

Um ensaio de fortificação consiste na adição de uma quantidade conhecida de analito (*spike*) à amostra em estudo em pelo menos três diferentes níveis de concentração. A quantidade recuperada pelo processo é calculada através da equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{amostra fortificada}} - C_{\text{amostra}}}{C_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad (23)$$

A gama de percentagem de recuperação geralmente aceite está compreendida entre os 70 e os 120%, mas pode variar dependendo da complexidade da matriz da amostra. [43, 48]

3.3.5. Limite de Detecção

O limite de deteção (LD) é dado como o valor da menor concentração da substância que pode ser detetado. Este pode ser determinado a partir da curva de calibração, utilizando a equação 24:

$$LD = \frac{3,3 \times s_{y/x}}{b} \quad (24)$$

em que $S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da curva.

3.3.6. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é o menor valor de concentração que pode ser medido para a substância em estudo, com precisão e exatidão.

Este limiar analítico também pode ser determinado a partir da curva de calibração e determinado pela equação:

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (25)$$

onde $S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da reta. [43]

3.4. Parte Experimental

3.4.1. Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura para IC da Sigma-Aldrich.

Na análise dos cátions, as soluções padrão foram preparadas a partir de um padrão multi-elementar de cátions para CI, da Sigma-Aldrich (Sódio 200 mg/L \pm 0,9 mg/L; Magnésio 200 mg/L \pm 0,9 mg/L e Cálcio 1000 mg/L \pm 4 mg/L). Para a preparação da fase móvel, foi utilizada uma solução ácido nítrico 1 mol/L, preparada a partir de ácido nítrico 65 % da Honeywell, ácido dipicolínico (\geq 99,5 % da Sigma-Aldrich) e água ultrapura para CI da Sigma-Aldrich.

Para os aniões, foram utilizadas soluções padrão preparadas a partir de um padrão multi-elementar de aniões para CI, da Sigma-Aldrich (Fluoreto 3 mg/L, cloreto 10 mg/L, 20 mg/L de nitrato e sulfato e 30 mg/L de fosfato). Para a preparação das soluções foi utilizada água ultrapura para CI da Sigma-Aldrich. Foi utilizado carbonato de sódio anidro (Fluka a 99 %), para preparar o eluente.

Para a supressão química foi utilizado uma solução de ácido sulfúrico para CI (0,1 mol/L da Sigma-Aldrich).

3.4.2. Material e equipamento

Para a determinação e quantificação dos iões foi utilizado um cromatógrafo iónico da marca Metrohm, modelo 930 Compact CI Flex e um amostrador modelo 919 IC Autosampler Plus.

Para a determinação de catiões foi utilizada a coluna Metrosep C6 – 150/4.0 e a pré-coluna Metrosep C4 Guard/4.0, também da marca Metrohm. Para os aniões foi utilizada a coluna Metrosep A Supp 7 – 250/4.0 e a pré-coluna Metrosep A Supp 4/5 S-Guard/4.0, da mesma marca.

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica OHAUS Pioneer. Foram utilizadas micropipetas Socorex de 100-1000 µL e de 1-10 mL para a preparação dos padrões e balões volumétricos Skylab de volumes diferentes.

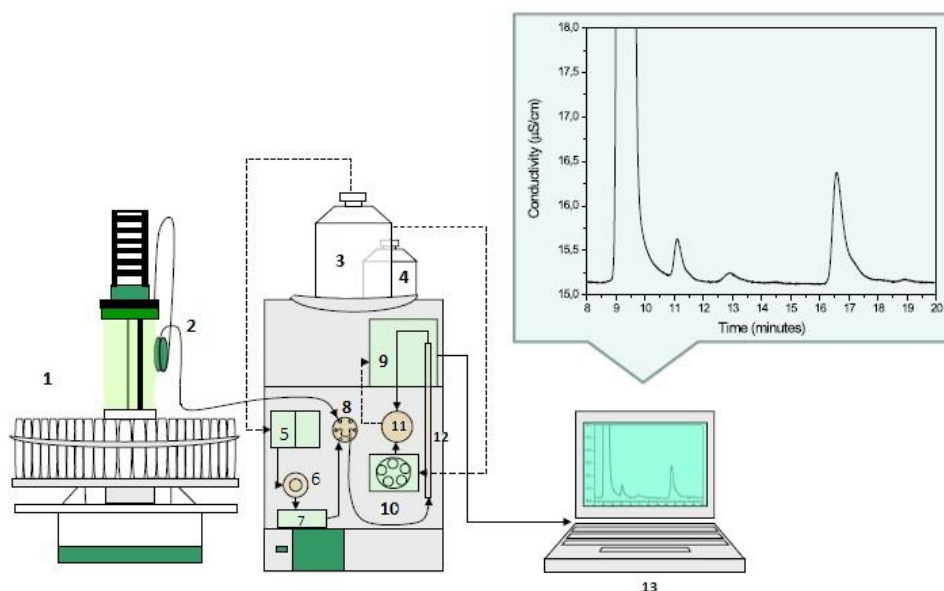


Fig. 11 - Esquema exemplificativo da cromatografia iônica utilizada: 1) amostrador; 2) bomba peristáltica; 3) eluente; 4) solução de ácido sulfúrico (apenas utilizada para a determinação de aniões); 5) bomba isocrática; 6) válvula de purga; 7) amortecedor; 8) válvula de injeção com um loop de 20 µL; 9) detector de condutividade; 10) bomba peristáltica; 11) supressor químico; 12) coluna de separação; 13) computador.

Fonte: imagem retirada e adaptada de [49]

3.4.3. Análise de catiões

A análise de catiões teve como objetivo identificar e quantificar os iões cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+) e magnésio (Mg^{2+}).

A fase móvel para o estudo dos catiões foi preparada dissolvendo em água ultrapura, num balão volumétrico de 2 L, 568 mg de ácido dipicolínico e 3,4 mL de ácido nítrico 1 mol/L.

Foram preparadas soluções padrão com 5 níveis de concentração, em balões de 25 mL, a partir do padrão dos três cátions, com diferentes concentrações e foram preparadas em cada sessão de trabalho.

A determinação do sódio, cálcio e magnésio foi feita utilizando a coluna Metrosep C6 com empacotamento de sílica gel com grupos carboxílicos e dimensões de 150 x 4.0 mm. As injeções foram automáticas num *loop* com capacidade de 20 µL e foi utilizado um detetor de condutividade. A aquisição dos dados de cada análise foi realizada através do software MagICnet.

Para a avaliação quantitativa dos analitos catiónicos foi utilizado um fluxo de 0,9 mL/min e o tempo total de corrida foi de 30 minutos, à temperatura de 30 °C. Para a análise catiónica não é utilizada supressão, o que significa que a condutividade ronda os 800-900 µS/cm, sendo a preparação do eluente crucial para a manter nestes valores.

Depois de ligar o equipamento e antes de proceder à injeção da amostra, é necessário equilibrar o sistema. Para isso, coloca-se o eluente a correr no equipamento até a linha de base seja estável. O equilíbrio é verificado pela linha de base, que tem que ser constante, sem picos e a condutividade tem que ser a desejada, no caso dos cátions com o eluente referido a condutividade ronda os 800 – 900 µS/cm.

Tabela 7 - Tabela resumo das condições experimentais para a determinação dos cátions

Coluna	Metrosep C6 – 150/4.0
Eluente	Ácido nítrico/ácido dipicolínico
Fluxo	0,9 mL/min
Temperatura	30,0 °C
Tempo de corrida	30 minutos

3.4.4. Análise de aniões

Nesta parte do trabalho foram identificados os aniões fluoreto (F⁻), cloreto (Cl⁻), nitrato (NO₃⁻), sulfato (SO₄²⁻) e fosfato (PO₄³⁻).

Neste estudo, o eluente foi preparado através da dissolução de 763 mg de carbonato de sódio em água ultrapura, para um balão volumétrico de 2 L.

Procedeu-se à preparação das soluções padrão com 5 níveis de concentração, em balões volumétricos de 25 mL.

Os aniões foram determinados com recurso da coluna Metrosep A Supp 7 com empacotamento de álcool polivinílico e grupos de amónio quaternário com dimensões 250 x 4,0 mm. Foi utilizado um detetor de condutividade. Foram feitas injeções de 20 µL e a aquisição de dados foi feita através do *software* MagICnet.

Para determinar os aniões foi utilizado um fluxo de eluente de 0,7 mL/min e tempo de corrida de 50 min, à temperatura de 45,0 °C. Neste caso, foi utilizada supressão química, onde foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico 0,1 mol/L para regenerar o supressor. Por isso, a condutividade rondou os 1-1,5 µS/cm. A pressão foi mantida entre os 9-10 MPa.

Depois de ligar o equipamento e antes de proceder à injeção da amostra, é necessário estabilizar a linha de base. Para isso, coloca-se o eluente a correr no equipamento até que este atinja o equilíbrio. O equilíbrio é verificado pela linha de base, que tem que ser constante. No caso dos aniões e como a sua determinação envolve supressão química, apareceram picos negativos de 10 em 10 minutos, relativos ao supressor. A condutividade do eluente, neste caso, deve ser próxima de 1 µS/cm.

Tabela 8 - Resumo das condições experimentais dos aniões

Coluna	Metrosep A Supp 7 – 250/4.0
Eluente	Carbonato de sódio 3,6 mmol/L
Fluxo	0,7 mL/min
Temperatura	45,0 °C
Tempo de corrida	50 min

3.4.5. Amostras de água

As amostras de água foram recolhidas diariamente da torneira, colocadas em tubos de plástico específicos para o amostrador e injetadas sem qualquer tipo de tratamento.

3.5. Resultados e discussão

3.5.1. Seletividade

Foi possível avaliar a seletividade através da comparação dos cromatogramas da matriz isenta de analitos, água ultrapura, com essa mesma matriz adicionando os analitos com interesse no estudo (padrões).

Na figura 12 estão representados os cromatogramas referentes à análise dos catiões em estudo, nas soluções padrão com concentrações diferentes. Observou-se que os

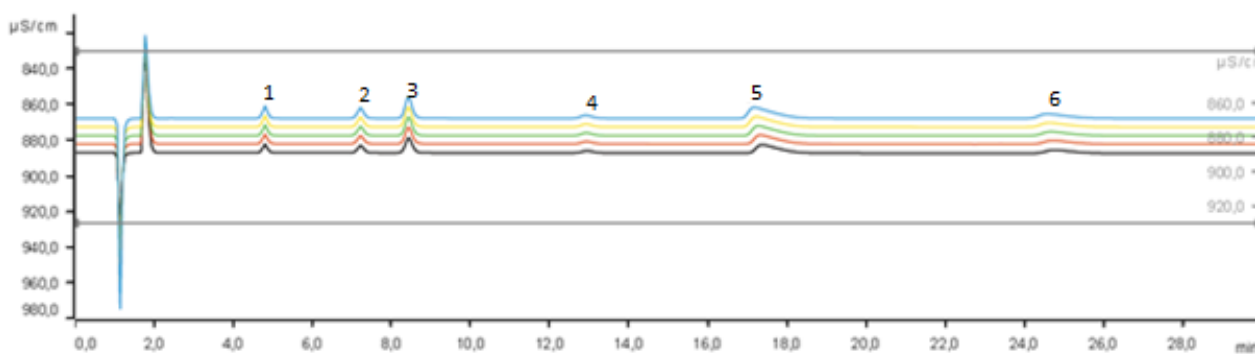


Fig. 13 - Cromatograma representativo da gama de trabalho referente aos cátions nos 5 níveis de concentração. A preto estão representados os cátions do padrão 1, a vermelho o padrão 2, a verde o padrão 3, a amarelo o padrão 4 e a azul a solução padrão 5. Na vertical lemos a condutividade expressa em $\mu\text{S}/\text{cm}$ e no eixo horizontal o tempo de corrida em minutos e, consequentemente, o tempo de retenção de cada cátion.

cátions em estudo: sódio (pico 2), cálcio (pico 5) e magnésio (pico 6) apresentam tempos de retenção de 7, 17 e 24 minutos, respetivamente, o que seria de esperar, dado as condições da coluna do fabricante. Os picos 1, 3 e 4 representam, por ordem, os cátions lítio (4,80 min), amónio (11,10 min) e potássio (12,98 min). Por falta de tempo e por estes se encontrarem fora da gama de trabalho, estes cátions não foram estudados (seria necessário fazer curvas de calibração novas). Comparando com o cromatograma obtido para a água ultrapura conclui-se que não há nenhum interferente na matriz isenta de cátions e, por isso, nada mais deverá eluir no tempo de retenção dos cátions em estudo. No cromatograma da figura 12 estes iões estão bem separados dos demais iões presentes na matriz do padrão. Logo, o método é considerado seletivo devido à sua capacidade de determinar os cátions sódio, cálcio e magnésio.

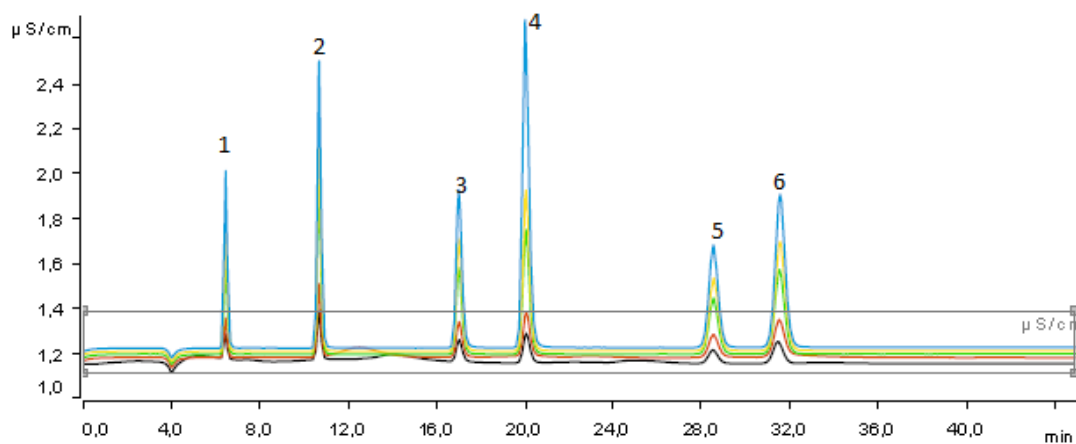


Fig. 12 - Cromatograma representativo da gama de trabalho referente aos aniões nos 5 níveis de concentração. A preto estão representados os aniões referentes ao padrão 1, a vermelho o padrão 2, a verde o padrão 3, a amarelo o padrão 4 e a azul a solução padrão 5.

Na figura 13, estão representados os picos obtidos para os aniões. O pico 1 representa o fluoreto (6,45 min), o pico 2 o anião cloreto (10,87 min), o pico 3 o anião brometo (17,72 min), o pico 4 o anião nitrato (21,00 min), o pico 5 o anião fosfato (28,60 min) e o pico 6 o anião sulfato (31,30 min). Para os aniões, o método também foi considerado seletivo, uma vez que os picos se encontram bem separados e que não se verificou a presença de interferentes no cromatograma.

3.5.2. Gama de trabalho e linearidade

A escolha da gama de trabalho, foi crucial para começar o processo de validação, pois é a gama de trabalho que vai permitir a quantificação do analito de forma exata. Por isso, foram preparadas uma série de soluções padrão, com concentração de iões conhecida. As tabelas 9 e 10 apresentam as gamas de trabalho finais para os diversos iões.

Tabela 9 - Gama de trabalho escolhida para os catiões, em padrões mistos

Padrão	Concentração / (mg/L)		
	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
1	4,00	4,00	20,00
2	8,00	8,00	40,00
3	12,00	12,00	60,00
4	16,00	16,00	80,00
5	20,00	20,00	100,00

Tabela 10 - Gama de trabalho escolhida para os aniões, em padrões mistos

Padrão	Concentração / (mg/L)				
	F ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
1	0,045	0,15	0,30	0,45	0,30
2	0,075	0,25	0,50	0,75	0,50
3	0,15	0,50	1,00	1,50	1,00
4	0,225	0,75	1,50	2,25	1,50
5	0,30	1,00	2,00	3,00	2,00

Os padrões foram preparados diariamente, em 5 dias consecutivos, e cada nível de concentração foi lido duas vezes por dia, com as mesmas condições das amostras a analisar. Depois de analisadas, foi feito um gráfico de calibração (sinal do equipamento

em função da concentração) e foram determinadas as concentrações dos iões nas amostras, por interpolação. As figuras 14 e 15 mostram a representação gráfica das curvas de calibração para o catião sódio e para o anião fluoreto, respetivamente.

Uma vez que a metodologia envolve o traçado da curva de calibração, recorreu-se a testes de homogeneidade de variâncias, para proceder à validação da gama de trabalho.

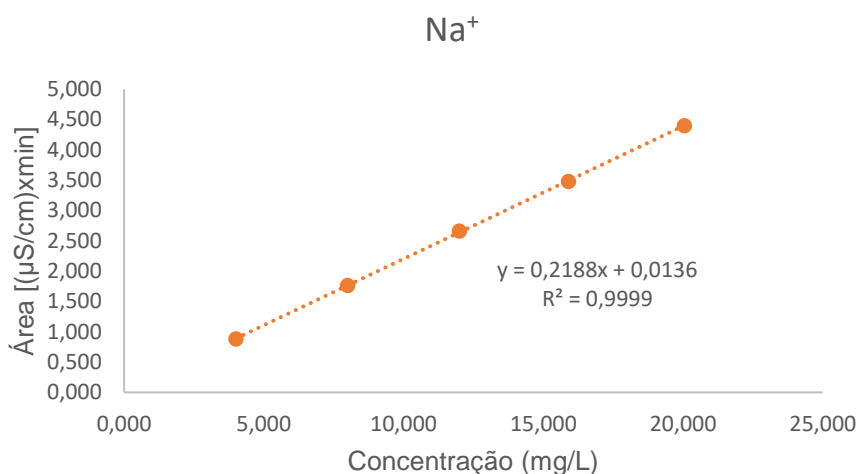


Fig. 14 – Representação do gráfico da curva de calibração do catião sódio.

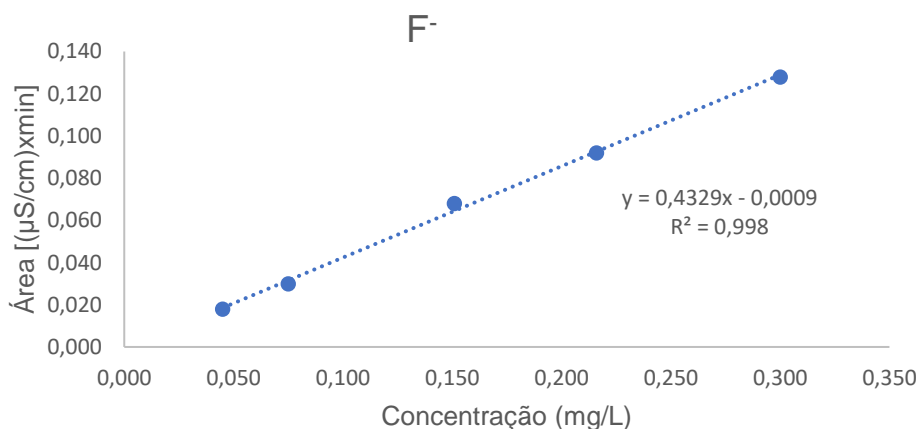


Fig. 15 - Representação do gráfico da curva de calibração do anião fluoreto.

Com o intuito de testar a homogeneidade das variâncias foi aplicado o teste F às variâncias obtidas para o primeiro e último nível de concentração dos padrões. Tanto para os cátions como para os aniões, o primeiro e último padrão da gama de concentração, foram analisados em 10 réplicas independentes durante 5 dias, como recomendado no GUIA RELACRE. Nas tabelas seguintes, 11 e 12, estão representados os valores das médias (\bar{x}), desvios padrão (σ) e variâncias (s^2), obtidos para dez leituras dos padrões 1 e 5, tanto para cátions como para os aniões. A partir destes valores é calculado o F_{exp} , para que posteriormente seja comparado com o F_{crit} . O F_{crit} foi calculado para n-1 graus de liberdade e para um determinado nível de confiança (95%). Todos os cálculos foram realizados com o *software* Excel.

Tabela 11 - Resultados obtidos para o estudo de homogeneidade de variâncias, através do teste Fischer, dos cátions em estudo

	Padrão	\bar{x} / (mg/L)	σ / (mg/L)	s^2 / (mg/L ²)	F_{exp}	F_{crit} (0,95;9;9)	Conclusão
Na ⁺	1	4,029	0,064	0,0041	1,58	3,18	$F_{exp} \leq F_{crit}$ Homogeneidade
	5	20,09	0,10	0,010			
Mg ²⁺	1	4,04	0,11	0,012	1,37	3,18	$F_{exp} \leq F_{crit}$ Homogeneidade
	5	20,09	0,09	0,009			
Ca ²⁺	1	19,98	0,08	0,007	31,81	3,18	$F_{exp} > F_{crit}$ Heterogéneo
	5	100,40	0,47	0,22			

Tabela 12 - Resultados obtidos para o estudo de homogeneidade de variâncias, através do teste Fischer, dos aniões em estudo

	Padrão	\bar{x} / (mg/L)	σ / (mg/L)	s^2 / (mg/L ²)	F_{exp}	F_{crit} (0,95;9;9)	Conclusão
F ⁻	1	0,044	0,002	0,000003	282,74	3,18	$F_{exp} > F_{crit}$ Heterogéneo
	5	0,31	0,03	0,001			
Cl ⁻	1	0,14	0,02	0,0003	40,00	3,18	$F_{exp} > F_{crit}$ Heterogéneo
	5	1,05	0,11	0,012			
NO ₃ ⁻	1	0,27	0,08	0,007	8,48	3,18	$F_{exp} > F_{crit}$ Heterogéneo
	5	2,19	0,24	0,056			
PO ₄ ³⁻	1	0,50	0,07	0,005	34,69	3,18	$F_{exp} > F_{crit}$ Heterogéneo
	5	3,08	0,42	0,17			
SO ₄ ²⁻	1	0,29	0,07	0,004	9,76	3,18	$F_{exp} > F_{crit}$ Heterogéneo
	5	2,10	0,20	0,04			

A partir da análise das tabelas é possível concluir que para os cátions sódio e magnésio o $F_{exp} \leq F_{crit}$ e, portanto, podemos concluir que não há diferenças significativas entre as variâncias, sendo a resposta instrumental homogénea. Nos restantes iões

apresentaram resposta instrumental com dispersão heterogénea, sendo o F_{exp} maior do que o F_{crit} .

Para testar a linearidade, foram representadas graficamente a dependência do sinal instrumental de cada um dos iões em função da concentração.

As tabelas 13 e 14 apresentam as equações e os R^2 obtidos para os iões em estudo.

Tabela 13 - Resumo das equações das retas obtidas para os catiões em estudo, a partir de 5 pontos, e respetivos coeficientes de correlação

	Gama de trabalho / (mg/L)	Equação da reta	R^2
Na^+	4,00 – 20,00	$y = 0,2188x + 0,0136$	0,9999
Mg^{2+}	4,00 – 20,00	$y = 0,4008x - 0,0339$	0,9999
Ca^{2+}	20,00 - 100,00	$y = 0,1792x - 0,119$	0,9999

Tabela 14 - Resumo das equações das retas obtidas para os aniões em estudo, a partir de 5 pontos, e respetivos coeficientes de correlação

	Gama de trabalho / (mg/L)	Equação da reta	R^2
F^-	0,045 – 0,30	$y = 0,4329x - 0,0009$	0,9980
Cl^-	0,15 – 1,00	$y = 0,2503x + 0,0111$	0,9970
NO_3^-	0,30 – 2,00	$y = 0,1886x - 0,0148$	0,9978
PO_4^{3-}	0,45 – 3,00	$y = 0,0779x - 0,0028$	0,9993
SO_4^{2-}	0,30 – 2,00	$y = 0,1739x + 0,0156$	0,9963

É possível constatar, que os coeficientes de determinação obtidos são superiores a 0,995 (valor de aceitação interno). No entanto, a equação da reta não garante a existência de linearidade na gama de trabalho avaliada e, por isso, é necessário aplicar um teste estatístico, como é o caso do teste de Mandel, para afirmar a existência de linearidade.

Tabela 15 - Resultados do teste estatístico de Mandel para cada um dos catiões no estudo de linearidade

	$s^2_{y/x(1)} /$ (mg/L ²)	$s^2_{y/x(2)} /$ (mg/L ²)	VT	$F_{\text{crit}(1,N-3,95\%)}$	Conclusão
Na^+	0,0142	0,0153	0,580	18,51	$\text{VT} < F_{\text{crit}}$
Mg^{2+}	0,0325	0,0389	0,102		$\text{VT} < F_{\text{crit}}$
Ca^{2+}	0,0637	0,0780	0,00178		$\text{VT} < F_{\text{crit}}$

Tabela 16 - Resultados do teste estatístico de Mandel para cada um dos aniões no estudo de linearidade

	$s^2_{y/x(1)}/$ (mg/L ²)	$s^2_{y/x(2)}/$ (mg/L ²)	VT	$F_{crit(1,N-3,95\%)}$	Conclusão
F ⁻	0,00235	0,00227	1,23	18,51	VT < F _{crit}
Cl ⁻	0,00551	0,00498	1,67		VT < F _{crit}
NO ₃ ⁻	0,008	0,0081	0,9		VT < F _{crit}
PO ₄ ³⁻	0,00248	0,00193	2,95		VT < F _{crit}
SO ₄ ²⁻	0,0085	0,0084	1,1		VT < F _{crit}

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que para todos os iões o valor teste (VT) é menor que o valor de F_{crit} , o que vem confirmar que o modelo linear é o que melhor se ajusta aos pontos experimentais das medições realizadas, o que também se confirmou anteriormente por meio dos coeficientes de correlação obtidos, superiores a 0,995, que foram obtidos. Isto comprova que as curvas analíticas são lineares nos intervalos analisados, tanto para os iões com resposta homogénea como heterogénea.

3.5.3. Precisão

Como foi dito anteriormente, a precisão é a dispersão dos resultados entre ensaios repetidos da mesma amostra e nas mesmas condições experimentais. Para esta avaliação, a precisão foi estudada através da precisão intermédia. Para isso, foram feitas várias medições da mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, mas em dias diferentes. As medições foram feitas a partir da maior e menor concentração dos padrões. Cada nível de concentração foi lido 10 vezes, num total de 5 dias. Através dos resultados obtidos, foi calculado o CV. A tabela 17 mostra o resumo dos resultados.

Aplicando a equação 22, chegou-se a valor de CV aceitável de aproximadamente 20%, para aplicar a esta metodologia. Assim, todos com iões apresentam coeficiente de variação dentro do valor de coeficiente de variação aceitável, para os níveis de concentração maior e menor da gama de trabalho, exceto o ião nitrato e o ião sulfato, para a gama de concentração mais baixa, respetivamente, 29,60% e 22,39%.

Tabela 17 - Resumo do estudo da precisão do método em condições de precisão intermédia, para n=10, na gama superior e inferior de trabalho.

	Concentração / (mg/L)	CV / %
Na ⁺	4,00	1,57
	20,00	0,50
Mg ²⁺	4,00	2,69
	20,00	0,46
Ca ²⁺	20,00	0,42
	100,00	0,47
F ⁻	0,45	4,18
	3,00	9,79
Cl ⁻	0,15	12,45
	1,00	10,48
NO ₃ ⁻	0,30	29,60
	2,00	10,85
PO ₄ ³⁻	0,45	14,16
	3,00	13,57
SO ₄ ²⁻	0,30	22,39
	2,00	9,65

3.5.4. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método foram efetuados ensaios de recuperação a partir da fortificação de amostras. Como a exatidão pode variar ao longo de toda a gama de trabalho, foram feitos 3 níveis de fortificação e cada nível foi medido 3 vezes, tanto para catiões como para aniões.

Para os catiões, no primeiro nível de fortificação, foram adicionados 0,50 mL de padrão à amostra de água da torneira, no segundo foram adicionados 1,00 mL e para o terceiro 1,50 mL, utilizando balões volumétricos de 25,00 mL.

Nos ensaios de recuperação para os aniões foram adicionados 0,375 mL, 1,25 mL e 2,5 mL de padrão multi-elementar aniónico às amostras de água da torneira, para os níveis de fortificação 1, 2 e 3, respetivamente. Para a preparação destes, foram utilizados balões volumétricos de 25,00 mL.

As tabelas 18 e 19 apresentam as percentagens de recuperação obtidas para cada um dos iões, nos diferentes níveis de fortificação.

Tabela 18 - Recuperações médias (R) obtidas para os cátions em 3 níveis de fortificação (NF), com n=3

	NF	C _{amostra} / (mg/L) ¹	C _{padrão} / (mg/L)	C _{amostra} + C _{padrão} / (mg/L)	R / %
Na ⁺	1	11,376	4,00	15,13	94
	2		8,00	18,63	91
	3		12,00	22,60	94
Mg ²⁺	1	6,687	4,00	8,68	50
	2		8,00	13,74	88
	3		12,00	17,15	87
Ca ²⁺	1	26,544	20,00	44,13	88
	2		40,00	63,37	92
	3		60,00	82,21	93

Comparando os resultados obtidos, não existe grande variação entre os níveis três de fortificação para os cátions, exceto no primeiro nível de fortificação do magnésio, em que a percentagem obtida foi de 50%, fora do limite de aceitação (70 – 120%). Na generalidade, os valores permitem concluir que a variação de concentração do analito na amostra não influenciou a recuperação e o procedimento mostrou-se adequado para a quantificação dos cátions.

No entanto, para os aniões, os resultados foram bastante dispersos (Tabela 19).

Tabela 19 - Recuperações médias (R) obtidas para os aniões em 3 níveis de fortificação (NF), com n=3

	NF	C _{amostra} / (mg/L)	C _{padrão} / (mg/L)	C _{amostra} + C _{padrão} / (mg/L)	R / %
F ⁻	1	0,0924	0,045	0,145	116
	2		0,15	0,297	136
	3		0,30	0,431	144
Cl ⁻	1	14,0686	0,15	14,254	124
	2		0,50	14,725	131
	3		1,00	15,141	107
NO ₃ ⁻	1	2,3096	0,30	2,384	25
	2		1,00	3,182	87
	3		2,00	3,857	77
PO ₄ ³⁻	1	0,0820	0,45	0,514	96
	2		1,50	1,947	124
	3		3,00	3,366	109
SO ₄ ²⁻	1	25,8800	0,30	26,251	123
	2		1,00	26,459	58
	3		2,00	26,713	42

Pela análise dos resultados, verifica-se que há uma grande dispersão nos resultados obtidos para a percentagem de recuperação dos aniões. Todos os valores fora do intervalo de aceitação definido, 70 a 120%, estão destacados a negrito na tabela, para

uma melhor visualização. Estes valores podem indicar que a matriz ou o procedimento utilizado influenciaram a deteção dos analitos e, por isso, o método não foi capaz de identificar todo o analito presente. Neste caso, supõe-se que a coluna utilizada nos aniões pudesse não estar nas melhores condições, pode estar sobrecarregada de substâncias, visto que já tinha sido sujeita a um elevado número de ensaios.

3.5.5. Limiares Analíticos

Para técnicas analíticas de separação, o método mais utilizado para calcular os limiares analíticos é o método baseado nos parâmetros da curva analítica. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 20 e 21.

Tabela 20 - Limites analíticos associados ao método, para a determinação dos catiões

	b	$S_{y/x}$	LD / (mg/L)	LQ / (mg/L)
Na ⁺	0,2188	0,01421	0,21	0,65
Mg ²⁺	0,4007	0,03255	0,27	0,81
Ca ²⁺	0,1788	0,06368	1,2	3,6

Os cálculos para os limites analíticos foram efetuados utilizando o método baseado nos parâmetros da curva de calibração. Uma vez que se trata de um método cromatográfico, utilizar a medição do ruído pode ser subjetivo pois o LD e o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas (por exemplo, o tipo de coluna que está a ser utilizada e o seu tempo de utilização). Picos maiores podem aumentar o ruído e por isso resultar em limiares analíticos mais baixos.

Através dos valores obtidos, é possível verificar que os valores de LQ para todos os aniões são inferiores à concentração do primeiro padrão de calibração e, por isso, conclui-se que a gama de linearidade se encontra bem ajustada.

Tabela 21 - Limites analíticos associados ao método, para a determinação dos aniões

	b	$S_{y/x}$	LD / (mg/L)	LQ / (mg/L)
F ⁻	0,4329	0,0024	0,016	0,054
Cl ⁻	0,2503	0,0055	0,066	0,22
NO ₃ ⁻	0,1886	0,008	0,12	0,42
PO ₄ ³⁻	0,0779	0,0025	0,095	0,32
SO ₄ ²⁻	0,1739	0,0085	0,15	0,49

3.6. Análise amostras de água da torneira

Foram analisadas amostras de água da torneira, durante 6 dias, no mesmo ponto de colheita. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 22 e 23. São apresentadas as médias, o desvio padrão absoluto e relativo.

Tabela 22 - Análise dos catiões, durante 3 dias, através de cromatografia iónica, para n =5

	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	$\bar{x} \pm \sigma$ / (mg/L)	RSD / %	$\bar{x} \pm \sigma$ / (mg/L)	RSD / %	$\bar{x} \pm \sigma$ / (mg/L)	RSD / %
Na ⁺	11,38 ± 0,18	1,5	11,40 ± 0,13	1,7	12,03 ± 0,13	1,1
Ca ²⁺	26,54 ± 1,18	4,45	26,63 ± 0,84	3,2	27,98 ± 0,69	2,5
Mg ²⁺	6,69 ± 0,37	5,5	6,67 ± 0,13	1,9	6,54 ± 0,23	3,6

Tabela 23 - Resumo da análise dos aniões, durante 3 dias diferentes, através de cromatografia iónica, para n=5. Para determinar os aniões com *, a amostra foi dissolvida

	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	$\bar{x} \pm \sigma$ / (mg/L)	RSD / %	$\bar{x} \pm \sigma$ / (mg/L)	RSD / %	$\bar{x} \pm \sigma$ / (mg/L)	RSD / %
F ⁻	0,086 ± 0,004	5	0,084 ± 0,003	4	0,084 ± 0,005	6
* Cl ⁻	13,79 ± 0,79	5,7	14,35 ± 0,37	2,6	13,95 ± 0,06	0,4
NO ₃ ⁻	2,41 ± 0,05	2	2,37 ± 0,07	3	2,48 ± 0,04	2
PO ₄ ³⁻	< LD		< LD		< LD	
* SO ₄ ²⁻	26,23 ± 0,84	3,2	26,33 ± 0,72	2,7	26,61 ± 0,74	2,8

Para determinar a concentração exata do anião cloreto e sulfato, foi necessário proceder à diluição da amostra. Na primeira leitura, verificou-se que a concentração destes aniões era muito superior à gama de trabalho escolhida: 0,15 – 1,00 mg/L para o cloreto e 0,30 – 2,00 mg/L para o anião sulfato. Posto isto, foram preparadas soluções com fator de diluição de 1/40 num volume final de 25 mL e procedeu-se à medição das amostras, como descrito anteriormente, para determinar apenas a concentração destes dois aniões.

O anião fosfato, não foi quantificado, visto que o valor se apresentava abaixo do limite de quantificação do método. Todos os restantes iões das amostras de água apresentaram valores acima do LQ e foram quantificados de acordo com a aplicabilidade do método (tabelas 22 e 23).

As figuras 16 e 17 mostram um exemplo de um cromatograma obtido para os catiões e aniões, respetivamente, nas amostras de água da torneira. Através da observação dos cromatogramas podemos concluir que todos os iões eluíram nos tempos muito próximo aos iões contidos nos padrões.

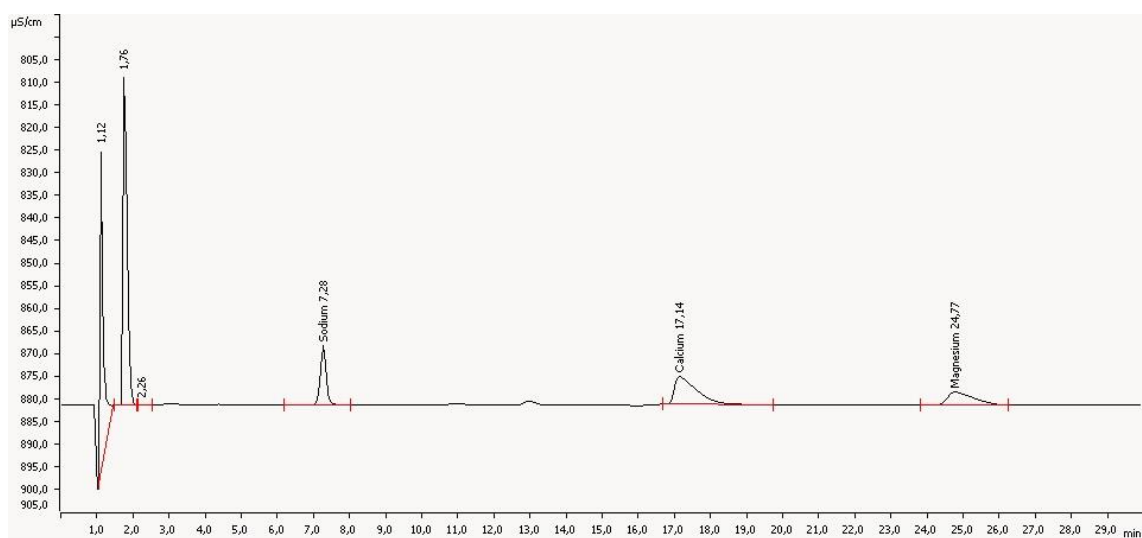


Fig. 16 - Cromatograma obtido para a análise dos cátions da água da torneira. O eixo das ordenadas representa a área e o eixo das abscissas representa o tempo de retenção.

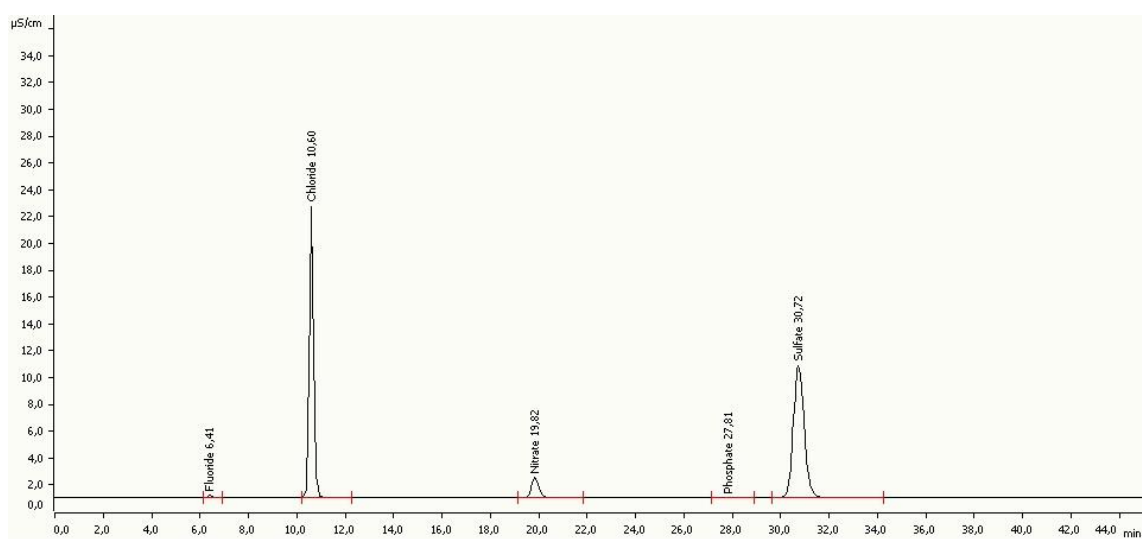


Fig. 17 - Cromatograma obtido para a análise dos aniões da água da torneira. O eixo das ordenadas representa a área e o eixo das abscissas representa o tempo de retenção.

3.7. Considerações finais

A cromatografia iónica para a análise de iões inorgânicos em amostras de água para consumo humano, mostrou ser um método seletivo e com boa sensibilidade para todos os iões em estudo. Com esta metodologia foi possível determinar a concentração de vários catiões em simultâneo em apenas 30 minutos. Para os aniões, o tempo de análise foi de 50 minutos e também foram determinados em simultâneo.

Foram obtidos bons coeficientes de correlação para todos os iões analisados e o método mostrou-se linear na gama de trabalho estudada.

O método apresentou boa repetibilidade, com coeficientes de variação inferiores a 20% para todos os iões, exceto para o nitrato e sulfato (29,60 % e 22,39 %, respetivamente) no primeiro nível de concentração analisado (0,30 mg/L). A precisão talvez pudesse ser melhorada, para este nível de concentração, aumentando o volume de injeção de amostra.

Foram obtidos valores de recuperação entre os 70-120 %, para os catiões, o que indica que o método apresenta boa exatidão para estes. No entanto, não foi conseguida boa exatidão para os aniões fluoreto e cloreto, observando-se valores de recuperação fora do intervalo de aceitação.

Em suma, esta metodologia poderia ser implementada para a determinação dos catiões em estudo. No entanto, para a determinação dos aniões, os resultados não foram satisfatórios. Futuramente, seria necessário otimizar as condições de trabalho como a temperatura ou o volume de injeção de amostra (para o caso dos fosfatos). Outro fator a ter em conta é o cuidado na utilização das colunas. A coluna dos aniões talvez precisasse de ser regenerada ou substituída, antes de novas medições, visto que já foi bastante utilizada e o depósito de substâncias na coluna pode estar a afetar os resultados.

Este projeto de estágio, proporcionou a oportunidade de estar em contato com diversos equipamentos e *softwares* que, até à realização do mesmo, não tinha conhecimento prático.

IV. Referências bibliográficas

1. Srivastava, S.K., Verma, R. and Gupta, B.D. *Surface plasmon resonance based fiber optic sensor for the detection of low water content in ethanol*. Sensors and Actuators B: Chemical, **153**(1),194-198 (2011).
2. Leão, T.P, et al., *Determinação do teor de água em etanol pela técnica de condutividade elétrica* Gl. Sci. Technol., **3**(2), 19-29 (2010).
3. De Caro, C.A., Aichert, A. and Walter, C.M., *Efficient, precise and fast water determination by the Karl Fischer titration*. Food Control, **12**(7), 431-436 (2001).
4. Inagaki, S., et al., *Characterization of Certified Reference Material for the Quantification of Water in Bioethanol*. Analytical Sciences, **28**(11), 1089-1095 (2012).
5. Fischer, K., *A new method for the analytical determination water in liquids and solids*. Angewandte Chemie, **48**, 394-396 (1935).
6. Scholz, E., *Karl Fischer Titration: Determination of Water*. Berlin: Springer Verlag (1984).
7. Riley, C.M., Rosanske, T.W. and Riley, S.R., *Specification of drug substances and products - Development and validation of analytical methods*, USA Elsevier (2014).
8. Brutel, P. and Schilink, R., *Water determination by Karl Fischer Titration*, Switzerland, Metrohm (2006).
9. Smith, D.M., Bryant, W. and Mitchell, J., *Analytical Procedures Employing Karl Fischer Reagent. I. Nature of the Reagent*. Journal of the American Chemical Society, **61**(9), 2407-2412 (1939).
10. Verhoef, J.C. and Barendrecht, E., *Mechanism and Reaction-Rate of Karl-Fischer Titration Reaction .1. Potentiometric Measurements*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **71**(3), 305-315 (1976).
11. Verhoef, J.C. and Barendrecht, E., *Mechanism and Reaction-Rate of Karl Fischer Titration Reaction .5. Analytical Implications*. Analytica Chimica Acta, **94**(2), 395-403 (1977).
12. *Good Titration Practice in Karl Fischer Titration*, Mettler Toledo (2011)
13. Margolis, S.A., *Source of the difference between the measurement of water in hydrocarbons as determined by the volumetric and coulometric Karl Fischer methods*. Analytical Chemistry, **71**(9), 1728-1732 (1999).
14. <https://www.metrohm.com/de-de/produkte/%7B805F8957-AB71-4E1E-A356-8E1B537354B7%7D>, acedido em 26 de julho de 2017.
15. *Guia RELACRE 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química*, Portugal: RELACRE (2000)

16. Lachenmeier, D.W., et al., *Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor*. Chem Cent J, **4**, 5 - 18 (2010).
17. *Application Report: Alcohol Measurement in Wine Using the Anton Paar Alcolyzer Wine M*, Anton Paar: Austria, 2 (Sem ano).
18. dos Santos, C.A.T., Páscoa, R.N.M.J. and Lopes, J.A., *A review on the application of vibrational spectroscopy in the wine industry: From soil to bottle*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, **88**, 100-118 (2017).
19. Blanco, M. and Villarroya, I., *NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, **21**(4), 240-250 (2002).
20. Pasquini, C., *Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications*. Journal of the Brazilian Chemical Society, **14**, 198-219 (2003).
21. *A guide to near-infrared spectroscopy analysis of industrial manufacturing processes*, Switzerland: Metrohm (2014).
22. <https://www.anton-paar.com/sq-en/products/details/alcolyzer-wine-mme-wine-analysis-system/>, acedido em 19 de junho de 2017
23. *Instruction Manual: Alcolyzer Beer M , Alcolyzer Spirits M, Alcolyzer Wine/Sake M*, Austria: Anton Paar (2016).
24. Caldas, B.S., et al., *Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida*. Scientia Chromatographica, **7** (1), 53-63 (2015).
25. Barroso, M., et al., *Refratometria na determinação do teor de açúcar e de aspartame em bebidas comerciais*, 61-64, disponível em <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/616/article/30001169/pdf>, acedido em 14 de julho de 2017.
26. Santos, G.L., Gemmer, R.E. and Oliveira, E.C., *Análise de açúcares totais, redutores e não-redutores em refrigerantes pelo método titulométrico de Eynon-Lane*. Revista destaques Académicos, **8**(4), 186-197 (2016).
27. Dongare, M.L., Buchade, P.B. and Shaligram, A.D., *Refractive index based optical Brix measurement technique with equilateral angle prism for sugar and Allied Industries*. Optik - International Journal for Light and Electron Optics, **126**(20), 2383-2385 (2015).
28. Kar, A., *Pharmaceutical Drug Analysis*. New Delhi New Age Internacional (2007).
29. Dornemann, G.M., *Comparação de Métodos para Determinação de Açúcares Redutores e Não-redutores*, in *Engenharia Química*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (2016).
30. http://cropme.club/openphoto.php?img=http://www.anton-paar.com/uploads/RTEmagicC_schematic_setup.jpg, acedido em 22 de julho de 2017.

31. http://shop.anton-paar.com/media/catalog/product/cache/4/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/a/b/abbemat200_re.jpg, acedido em 22 de julho de 2017.
32. http://shop.anton-paar.com/media/catalog/product/cache/36/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/d/m/dma_35_vor_gr.jpg, acedido em 22 de julho de 2017.
33. Saleh, M.A., et al., *Chemical evaluation of commercial bottled drinking water from Egypt*. Journal of Food Composition and Analysis, **14**(2), 127-152 (2001).
34. *DIRECTIVA 98/83/CE DO CONSELHO de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano*. Jornal Oficial das Comunidades Europeias (1998), disponível em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=PT>.
35. *Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto* (1998), disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/430457>.
36. Fawell, J., et al., *Fluoride in Drinking-water*. London, UK IWA Publishing (2006).
37. *Guidelines for Drinking-water Quality*. 3rd Edition ed. Vol. Volume 1 - Recommendations, Geneva: World Health Organization (2004).
38. Vasudevan, S., et al., *Studies on the removal of phosphate from drinking water by electrocoagulation process*. Industrial & Engineering Chemistry Research, **47**(6), 2018-2023 (2008).
39. Rubenowitz, E., G. Axelsson, and R. Rylander, *Magnesium and calcium in drinking water and death from acute myocardial infarction in women*. Epidemiology, **10**(1), 31-36 (1999).
40. Eith, C., et al., *Practical Ion Chromatography - An Introduction*, 2nd Edition, Switzerland: Metrohm (2007).
41. Small, H., Stevens, T.S. and Bauman, W.C., *Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection*. Analytical Chemistry, **47**(11), 1801-1809 (1975).
42. Haddad, P.R. and Jackson, P.E., *Ion chromatography - principles and applications*. Journal of Chromatography Library Vol. 46. Elsevier (2003).
43. Ribani, M., et al., *Validation for chromatographic and electrophoretic methods*. Quimica Nova, **27**(5), 771-780 (2004).
44. Harris, D.C., *Quantitative chemical analysis*. 7th ed., New York, W.H. Freeman and Co. (2007).
45. Gonçalves, M.E.P., et al., *Validação do método de determinação simultânea dos íons brometo e bromato por cromatografia iônica em águas de consumo humano*. Química Nova, **27**, 503-507 (2004).
46. Videira, A.V.S., *Validação do método de ensaio para análise de ácidos haloacéticos*. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa: Lisboa (2012).

47. Wood, R., *How to validate analytical methods*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, **18**(9-10), 624-632 (1999).
48. Morris, A.S., *Measurement and Calibration Requirements for Quality Assurance to ISO 9000*. Wiley (1998).
49. Lopez-Moreno, C., Perez, I.V. and Urbano, A.M. *Development and validation of an ionic chromatography method for the determination of nitrate, nitrite and chloride in meat*. Food Chemistry, **194**, 687-694 (2016).